



UNIVERSIDAD POPULAR AUTÓNOMA DEL ESTADO DE PUEBLA

Centro Interdisciplinario de Posgrados Investigación y
Consultoría

Departamento de Ciencias Biológicas

Doctorado en Biotecnología

TESIS

*Efecto de la bebida de aguamiel fermentada con probióticos en la
microbiota intestinal de estudiantes universitarios mexicanos con
estrés*

Para obtener el título de:

DOCTORA EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

cDra. Laura Márquez Morales

Directora

Dra. Beatriz Pérez Armendáriz

Co-director

Dr. Elie Girgis El Kassis

Asesor:

Dra. Judith Cavazos Arroyo

Dr. Fidel Martínez Gutiérrez

Puebla, Pue.

Noviembre 2020



UPAEP – Secretaría General

Dirección General de Apoyos Académicos

Dirección del Centro de Recursos para el Aprendizaje y la Investigación.

Biblioteca Central - **Karol Wojtyla**

Tesis Digitales Restricciones de uso:

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de textos, imágenes, gráficas, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente de donde la obtuvo mencionando el autor o autores involucrados en el documento.

Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Universidad Popular Autónoma del Estado de Puebla

Decanato de Ciencias Biológicas

Facultad de Biotecnología

Doctorado en Biotecnología

Se aprueba la Tesis:

Nombre de la tesis

Efecto de la bebida de aguamiel fermentada con probióticos en la microbiota intestinal de estudiantes universitarios mexicanos con estrés

Nombre del Alumno

Laura Márquez Morales

Comité Asesor

Directora de Tesis

Dra. Beatriz Pérez Armendáriz

Co-Director

Dr. Elie Girgis El Kassis

Asesora

Dra. Judith Cavazos Arroyo

Asesor externo

Dr. Fidel Martínez Gutiérrez

Puebla, México.

24 de noviembre de 2020.

DEDICATORIA

*Este fascinante trabajo está dedicado a las personas más valiosas de mi vida, mis hijos **Andrés Iván** Castañeda Márquez y **Jocelin** Castañeda Márquez, gracias por su incondicional amor, apoyo y fuerza espiritual que me acompañan en cada aventura que emprendo.*

Agradecimientos

Gracias Dios por tanta felicidad en mi vida.

A las mujeres más hermosas e incondicionales de toda la vida mi madre Teresa y mis hermanas Marina, Lupita y Lidia.

A las personas especiales que me han brindado su amor, confianza y apoyo incondicional son muchas y no terminaría de escribir sus nombres.

A mi hermano Pablo por su apoyo incondicional y su amor.

Al CONACYT por el apoyo otorgado.

A la Dra. Beatriz Pérez Armendáriz directora del proyecto de investigación gracias por sus enseñanzas y apoyo. Trabajar juntas en el inicio del doctorado de biotecnología fue una gran experiencia para las dos.

A mis asesores Dra. Judith Cavazos Arroyo, Dr. Elie Girgis El Kassis y el Dr. Fidel Martínez Gutiérrez gracias por dirigir este trabajo para que diera un resultado de alta calidad.

A la Decana de Ciencias Biológicas Laura Contreras Mioni por su apoyo y amistad.

A mi compañera de laboratorio y amiga Cony por su apoyo y amistad.

A mis compañeras del grupo de Microbiota-probióticos, Martha Alvarado, Sara, Ada, Michelle y Jimena, por su colaboración en todo momento.

¡Muchas gracias!

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo 1	8.
1. INTRODUCCIÓN.	9.
1.1 Planteamiento del Problema	10.
1.2 Preguntas de Investigación	10.
1.3 Justificación	11.
1.4 Objetivos	12.
1.5 Hipótesis	12.
Capítulo 2	13.
2. ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN	14.
2.1. Estrés en los seres humanos	14.
2.2. Estrés, cerebro y el sistema nervioso	14.
2.3. Estrés académico	16.
2.3.1. Trastorno y enfermedades asociadas con el estrés	18.
2.4. Probióticos, prebióticos, posbióticos y simbióticos	18.
2.4.1. Intervención con simbióticos, probióticos y prebióticos en estudiantes con estrés académico	19.
2. 5. Pulque, aguamiel, agave y sus probióticos	25.
2.5.1. Aguamiel y prebióticos	26.
2.5.2. Agave spp	27.
2.6. La microbiota	28.
2.6.1. La microbiota intestinal y su disbiosis	28.
2.6.2. La microbiota intestinal y el cerebro	29.
2.6.3. La microbiota, estrés y probióticos	31.
Capítulo 3	33.
3. METODOLOGÍA	34.
3.1. Diseño metodológico	34.
3.1.1. Diseño de la investigación	35.
3.1.2. Descripción general del estudio	35.
3.1.3. Muestra de estudio y criterio de inclusión	35.
3.1.4. Criterios de exclusión y eliminación	35.
3.2. FASE I. Elaboración de la bebida de aguamiel y probióticos del pulque	36.
3.2.1. Aislamiento de microorganismos a partir del pulque	36.
3.2.1.1. Selección e identificación de microorganismos	36.
3.2.1.2. Cuantificación de células viables	37.
3.2.2. Identificación de las cepas aisladas por espectrometría de masas	37.
3.2.3. Identificación molecular de las bacterias con características de BAL	39.
3.2.4. Cuantificación del crecimiento bacteriano	40.
3.3. FASE II. Elaboración de la bebida de aguamiel fermentada con probióticos del pulque	41.
3.3.4. Elaboración de bebida placebo	41.

3.4. FASE III. Intervención de los estudiantes con la bebida fermentada probiótica y la bebida placebo	42.
3.5. FASE IV. Análisis de la medición de estrés académico	42.
3.5.1. Método estadístico	42.
3.5.2. Instrumentos de medición	43.
3.5.2.1. Inventario de estrés académico SISCO	43.
3.5.2.2. Historia clínica	43.
3.6. FASE V. Análisis de la microbiota intestinal	44.
3.6.1. Recolección de las muestras de heces	44.
3.6.2. Extracción de ADN bacteriano de las heces	44.
3.6.3. Concentración y pureza del ADN	45.
3.6.4. Cuantificación de la <i>phyla Bacteroidetes, Firmicutes y Gammaproteobacterias</i> por qPCR	46.
3.6.5. Porcentaje de cambio en abundancia de los filos	47.
3.6.6. Análisis Estadístico de los cambios de abundancia en los filos	47.
Capítulo 4	49.
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	50.
4.1 FASE I. Elaboración de la bebida de aguamiel fermentada con probióticos	50.
4.1.1. Aislamiento de microorganismos a partir del pulque	50.
4.1.2. Selección e identificación de microorganismos	51.
4.1.2.1. Cuantificación de las bacterias viables	53.
4.1.2.2. Identificación de las cepas seleccionadas mediante espectrometría de masas	54.
4.1.2.3 Identificación molecular de <i>L. paracasei</i> , <i>L. plantarum</i> y <i>Lactobacillus brevis</i>	56.
4.1.3. Cuantificación del crecimiento microbiano	57.
4.2. Elaboración de la bebida probiótica	57.
4.2.1. Elaboración de la bebida placebo	59.
4.3. FASE II. Intervención de los estudiantes con la bebida probiótica y la bebida placebo	59.
4.3.1. Resultado del análisis descriptivo de los antecedentes patológicos no personales y personales	60.
4.3.1.1. Análisis descriptivo de los antecedentes personales no patológicos	60.
4.3.1.2. Análisis descriptivo de los antecedentes personales patológicos	61.
4.3.1.2. Resultados de la sintomatología de los estudiantes antes y después de la intervención con la bebida probiótica	63.
4.4. FASE III Análisis de la medición de estrés académico	64.
4.5 FASE IV. Análisis de la microbiota intestinal	69.
4.5.1 Entrega de muestras y extracción de ADN bacteriano a partir de heces	69.
4.5.2 Determinación de pureza y concentración de ácidos nucleicos	69.
4.5.3 Análisis de PCR en tiempo real	70.
4.5.3.1 Curva de calibración	69.
4.5.3.2 Resultados de qPCR en tiempo real	71.
4.5.4 Efecto del consumo de la bebida fermentada probiótica en la microbiota intestinal	72.
Capítulo 5	78.

5. CONCLUSIONES	79.
Artículo científico: Efectos de la ingestión de una bebida tradicional mexicana fermentada con bacterias del ácido láctico sobre el estrés en estudiantes de medicina	80.
ANEXOS.	81.
1. Consentimiento bioético	A-81.
2. Consentimiento informado	A-82.
3. Instrumentos de medición	A-88.
4. Confidencialidad de los investigadores	A-94.
5. Análisis estadísticos	A-95.
A-1 Cálculo de rendimiento bacteriano de la phyla Bacteroidetes, Firmicutes y Gammaproteobacteria	A-95.
A-2 Resumen del cálculo estadístico de la phyla <i>Bacteroidetes</i> , <i>Firmicutes</i> y <i>Gammaproteobacterias</i>	A-96.
A-3 Pruebas estadísticas de la phyla <i>Bacteroidetes</i> , <i>Firmicutes</i> y <i>Gammaproteobacterias</i>	A-96.
A-4 Pruebas estadísticas del Inventario del estrés académico SISCO	A-109.
A-5 Carta Antiplagio	A-114.
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	117.
INDICE DE FIGURAS	
Figura 2-1. Esquema de los sistemas involucrados en la señal y respuesta de estrés.	15.
Figura 3-1. Diagrama de flujo del proceso de elaboración de bebida simbiótica	36.
Figura 3-2. Proceso del método para cuantificar las células viables	37.
Figura 3-3. Diagrama de flujo del proceso de elaboración de bebida simbiótica.	41.
Figura 3-4. Diagrama de flujo del proceso de intervención de los estudiantes	42.
Figura 4-1. Aislamiento de bacterias aisladas de pulque en medio MRS líquido a 37°C.	50.
Figura 4-2. Características morfológicas macroscópicas de las colonias aisladas de las cepas 15PAL, 12PAL y 4AAL	51.
Figura 4-3. Colonias aisladas y purificadas en medios diferenciados. A) Crecimiento de las colonias puras en medio MRS sólido. B) Colonias puras crecidas en medios selectivos C) Crecimiento de las colonias puras en gelosa sangre de carnero y gelosa humana	52.
Figura 4-4. Tinción de Gram de las cepas seleccionadas fueron observadas al microscopio 100X. Se observan la forma bacilos con bordes cuadrados, no móviles con disposición individual o en cadenas	53.
Figura 4-5. Densidad de población bacteriana contada en UFC/ml.	54.
Figura 4-6. Resultado en la identificación de las cepas 15PAL, 4AAL y 12PAL por MALDI-TOF.	55.
Figura 4-7. Extracción de ADN bacteriano de las cepas LB, LP, LPR.	56.
Figura 4-8. Alineamientos de las secuencias perteneciente a <i>L. paracasei</i> y <i>L. plantarum</i>	56.
Figura 4-9. Se presentan los diferentes comportamientos de las bacterias <i>L. paracasei</i> , <i>L. plantarum</i> y <i>L. brevis</i> en una cinética de crecimiento de 36 horas medido por densidad óptica cada 2 horas. En donde se observa que <i>L. brevis</i> con un menor crecimiento.	57.
Figura 4-10. Proceso de elaboración de la bebida de aguamiel fermentada con probióticos del pulque. a) Bebida inoculada con los probióticos, b) Incubación, c) Bebida fermentada, d) Envasado en recipientes estériles, e) Sellado hermético para garantizar esterilidad, f) Bebida fermentada probiótica	58
Figura 4-11. a) Bebida de coco utilizada, b) Medición de los °Brix, c) Saborizantes elegido de piña coco d) Prueba de degustación, d) Bebida placebo.	58.
Figura 4-12. Antecedentes patológicos familiares que incluye a los padres y a los abuelos. Se contó las personas en las familias con antecedentes patológicos en la línea materna y la línea paterna. Obesidad (OBE), hipertensión (HIP), diabetes (DIA), cáncer (CAN), dislipidemias (DIS), enfermedades cardíacas(ENF.CAR),	

enfermedades renales (ENF. REN), depresión (DEP). Se calcularon conteos y porcentajes para variables categóricas _____ 60.

Figura 4-13. Antecedentes patológicos y no patológico de los estudiantes. Porcentaje de estudiantes que presentaron el antecedente patológico y no patológicos: Consumo de alcohol (ALC), consumo de drogas (DRG), consumo de tabaco (FUM), vive con animales (VIAN), vegetariano (VEG), duerme 8 horas o más ($HS \geq 8hrs$), duerme de 6 a 7 horas ($HS 6-7 hrs$), duermen menos de 6 horas ($HS \leq 6 hrs$), tiene cirugías (CIR), es intolerante algún alimento (INTAL), presenta alergias (ALG). _____ 61.

Figura 4 14. Nivel de intensidad de estrés académico. Frecuencia de percepción de estrés: Niveles de estrés: N1, N2 (poco), N3, N4, N5 (mucho). A) Grupo CTL: Antes de la intervención con el control ACTL. Después de la intervención con control DCTL, ($p = .607$). B) Grupo experimental EXP: Antes de la intervención con la bebida hecha de aguamiel fermentada con bacterias ácido lácticas ABAFBAL. Después de la intervención con bebida hecha de aguamiel fermentada con bacterias ácido lácticas DBAFBAL, ($p < .001$). Se realizaron χ^2 de independencia. _____ 65.

Figura 4 15. Extracciones de ADN bacteriano de muestras de heces _____ 69.

Figura 4 16. Determinación de concentración (ng/μl) de ADN bacteriano. _____ 70.

Figura 4 17. Curvas de calibración estandar para el cálculo del número de copias del gen 16S RNAr de los filos *Firmicutes*, *Bacteroidetes* y *Gammaproteobacterias*. Fotografía tomada de tesis Alvarado, (2017) y Elorduy (2019). _____ 72.

Figura 4 18. Curva de disociación de algunas muestras para el gen 16S RNA de *Firmicutes* y la curva de amplificación con primers específicos BacF y R1378. _____ 72.

Figura 4 19. Curva de disociación de algunas muestras para el gen 16S RNA de *Gammaproteobacterias* y la curva de amplificación con primers específicos Bacecofw 1428 y Bacecorev. _____ 72.

Figura 4-20. Curva de disociación de algunas muestras para el gen 16S RNA de *Gammaproteobacterias* y la curva de amplificación con primers específicos Bacecofw 1428 y Bacecorev _____ 72.

Figura 4 21. Resultados del promedio de la *phyla* estudiada en los estudiantes con estrés ($n=27$) expresada en número de copias de ADN antes y después de la intervención con la bebida hecha de aguamiel fermentada con bacterias ácido lácticas BAFBAL y con el control CTL ($n=18$); a) Filo *Bacteroidetes* b) Filo *Firmicutes*, c) Filo *Gammaproteobacterias*. _____ 74.

Figura 4 22. Porcentajes de cambio en abundancia en gráfica de caja y bigote. Porcentaje de cambio en abundancia (%) estimada con los promedios de número de copias antes y después de la intervención con la bebida probiótica y placebo. $\% \text{ cambio de abundancia} = (TD - TA) / TD * 100$. _____ 75.

Figura 4 23. Determinación de concentración (ng/μl) de ADN bacteriano. _____ 77.

INDICE DE TABLAS

Tabla 2-1. Trastornos y alteraciones de estudiantes por estrés _____ 18.

Tabla 2-2 Los microorganismo usados como probióticos y nutrientes prebióticos _____ 19.

Tabla 2-3. Meta-análisis del uso sobre el consumo de probióticos y simbióticos en la salud humana _____ 20.

Tabla 2-4. Intervenciones con probióticos, prebióticos y simbióticos en individuos con estrés _____ 23.

Tabla 3-1. Significado de los valores de puntuación para la identificación del género y la especie _____ 39.

Tabla 3-2. Significado de las categorías de coherencia (A-C) _____ 39.

Tabla 3-3. Primers para la detección de filos _____ 46.

Tabla 4-1. Morfología de las colonias seleccionas vistas macroscópicamente y utilizando en contador de colonias _____ 51.

Tabla 4-2. Identificación del género y especie mediante el método de espectrometría de masas _____ 55.

Tabla 4-3. Resultados del análisis de tablas cruzadas y prueba χ^2 entre el tratamiento con simbiótico, placebo y la sintomatología que presentaron los sujetos. _____ 64.

Tabla 4 4. Resultados de la comparación antes y después de la intervención para los estresores del entorno (Prueba t), utilizando el cuestionario SISCO _____ 66.

Capítulo 1

1. INTRODUCCIÓN

El estrés académico es un trastorno psicológico cuya prevalencia ha aumentado en los últimos años en los estudiantes universitaria de medicina. La respuesta que se activa en el cuerpo cuando se está estresado por las demandas escolares genera diferentes reacciones a nivel fisiológico, emocional, cognitiva y conductual (Pozos-Radillo *et al.*, 2016).

Existe evidencia de que la microbiota intestinal está relacionada con el estrés, por la comunicación constante y bidireccional del eje microbiota-intestino-cerebro (Liang *et al.*, 2018). Recientemente los probióticos y prebióticos parecen estar vinculados en la comunicación del eje y su efecto sobre la reducción de estrés.

La organización de las naciones unidas de la alimentación y la agricultura (ONUAA/FAO), menciona que los simbióticos son productos que contienen probióticos y prebióticos que puede ser una alternativa que puede ayudar en algunos trastornos ocasionados por el estrés (Oliveira, G., y González-Molero, I., 2016). Investigaciones recientes han mostrado que los alimentos fermentados, tradicionales son una buena fuente de probióticos y prebióticos. En México, el Pulque -bebida milenaria-, es una buena fuente de bacterias ácido lácticas (LAB) con potencial probiótico (Escalante *et al.*, 2008). El aguamiel contiene inulina, puede actuar como prebiótico (Torres-Maravilla *et al.*, 2016) y ayudar a restablecer la microbiota gastrointestinal (Chandel *et al.*, 2017).

La presente investigación tiene como objetivo evaluar el efecto que tiene la bebida de aguamiel fermentada con probiótica del género *Lactobacillus* sobre la microbiota intestinal de estudiantes universitarios con estrés de la facultad de medicina. Los instrumentos que utilizaremos son: el inventario de estrés académico SISCO y la historia clínica. La cuantificación de los filos *Firmicutes*, *Bacteroidetes* y *Gammaproteobacterias* se hizo por amplificación del gen 16S ARNr por PCR en tiempo real.

Hay pocos estudios con intervenciones experimentales que empleen bebidas probióticas, sobre todo, los que se elaboran con productos como el pulque y aguamiel. Este estudio

pretende aportar conocimiento sobre la microbiota intestinal en la población mexicana y generar un producto biotecnológico no láctico que pueda reducir el estrés y mitigar los efectos que la acompañan.

1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La Organización Mundial de la Salud estima que para el año 2020, el estrés será la segunda causa de muerte en el mundo. Actualmente provoca 18,700 infartos anuales en México, colocándonos en primer lugar a nivel mundial (OMS, 2017).

La acumulación de estrés a largo plazo en los estudiantes universitarios tiene efectos detrimentales como bajo rendimiento cognitivo, que puede impactar la memoria, el razonamiento, la empatía, la capacidad de retención y la plasticidad mental, promoviendo la acumulación de diferentes trastornos y enfermedades a lo largo de la vida (De palma *et al.*, 2014). Debido a la comunicación bidireccional del eje cerebro-intestino-microbiota (Foster, J. A., Rinaman, L., y Cryan, J. F., 2017), los estados de estrés elevados y constantes aumentan los niveles de cortisol, ocasionando la activación de las noradrenalinas que pueden ocasionar una disbiosis en la microbiota intestinal. Investigaciones previas han establecido que el estrés académico está asociado con reacciones físicas, psicológicas, de comportamiento, pero con pocas alternativas de afrontamiento (Barraza, 2008). Esto ocasiona diferentes enfermedades y trastornos como la obesidad (Nakanishi *et al.*, 2018), diabetes (Tomasello *et al.*, 2016), esquizofrenia, enfermedad de Parkinson, autismo, depresión y estrés (Kim, Y.K., y Shin, C., 2018). Hay pocos estudios sobre la microbiota intestinal con intervenciones experimentales en humanos ya que la mayoría de los estudios se han realizado en modelos animales. Además, hay un conocimiento insuficiente acerca de cómo ayudar a restablecer el equilibrio en la microbiota intestinal mexicana utilizando bebidas probióticas, sobre todo, elaboradas con productos de la región de Puebla, como el pulque y aguamiel para mitigar las respuestas adversas (Tomasello *et al.*, 2016).

1.2 PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

1. ¿Cuál es el efecto de la bebida probiótica fermentada con probióticos del pulque en la microbiota intestinal mexicana de estudiantes con estrés durante un periodo escolar?

2. ¿Los niveles de estrés se redujeron con el consumo del simbiótico no láctico biotecnológico?

3. ¿Cuáles son los filos bacterianos alterados en la microbiota intestinal mexicana en el grupo muestra y control?

1.3 JUSTIFICACIÓN

El estrés en la vida estudiantil es sumatorio. En México, los profesionistas pasan casi 30 años en el ambiente escolar. Percibir estrés prepara el cuerpo para defenderse y favorece la supervivencia humana, sin embargo, la acumulación de estrés a largo plazo en los estudiantes universitarios tiene efectos desfavorables en el comportamiento y la salud (Kabito, G. G., Wami, S. D., Chercos, D. H., y Mekonnen, T. H., 2020). La fatiga, depresión y ansiedad son las manifestaciones más frecuentes en los estudiantes (Lazarevich *et al.*, 2018). Generar diferentes opciones de afrontarlo, como sería el uso de probióticos, puede mitigar el estrés y todos sus efectos sobre la microbiota intestinal. En años recientes, las investigaciones sobre intervenciones con psicobióticos en humanos han avanzado en esta línea (Nishida *et al.*, 2017). Estudios previos de intervenciones con probióticos elaborados con cepas de *Lactobacillos* han demostrado la reducción del estrés, así como efectos favorables en problemas digestivos y cambios de la microbiota intestinal (Kato-Kataoka *et al.*, 2016). Otras intervenciones con probióticos que contienen diferentes cepas de *Lactobacillos* y *Bifidobacterias*, tienen efectos en la memoria emocional y el razonamiento (Bagga *et al.*, 2018). Sin embargo, se han realizados pocos estudios con intervenciones experimentales con probióticos en humanos en poblaciones de estudiantes universitarios en el mundo. Existe la necesidad de conocer en la población de estudiantes mexicanos los niveles de estrés, sobre todo, en los estudiantes de medicina. Además, demostrar si una intervención con simbióticos pueda tener un impacto en la microbiota intestinal por reducir el estrés y mitigar sus efectos sería de gran utilidad como una forma de afrontarlo. Por lo tanto, este estudio aporta evidencia sobre el consumo de la bebida de aguamiel fermentada con probióticos del pulque en la dieta mexicana para mitigar las reacciones causadas por el estrés. Son pocos los trabajos con intervenciones experimentales que empleen una bebida probiótica no láctica. Pretendemos probar que tenga un efecto en la *phyla* bacteriana intestinal y que su consumo resulte en un beneficio para la salud de la población estudiantil de medicina de UPAEP. Principalmente

porque es vulnerable a diferentes factores estresantes que enfrenta como: exámenes, horarios de guardias intrahospitalarias, prácticas profesionales, internados, trabajos, entre otros. De esta manera se inicia un estudio experimental base que genere un producto innovador y conocimiento que ayude a entender la conexión de estrés y la microbiota intestinal mexicana.

1.4 OBJETIVOS

1.4.1 Objetivo general

Evaluar el efecto que tiene el consumo de la bebida simbiótica elaborada con prebióticos de aguamiel y bacterias del pulque sobre la microbiota intestinal de estudiantes de medicina con estrés, utilizando el inventario de estrés académico SISCO, la historia clínica y métodos moleculares (extracción de ADN, PCR, PCR-RT).

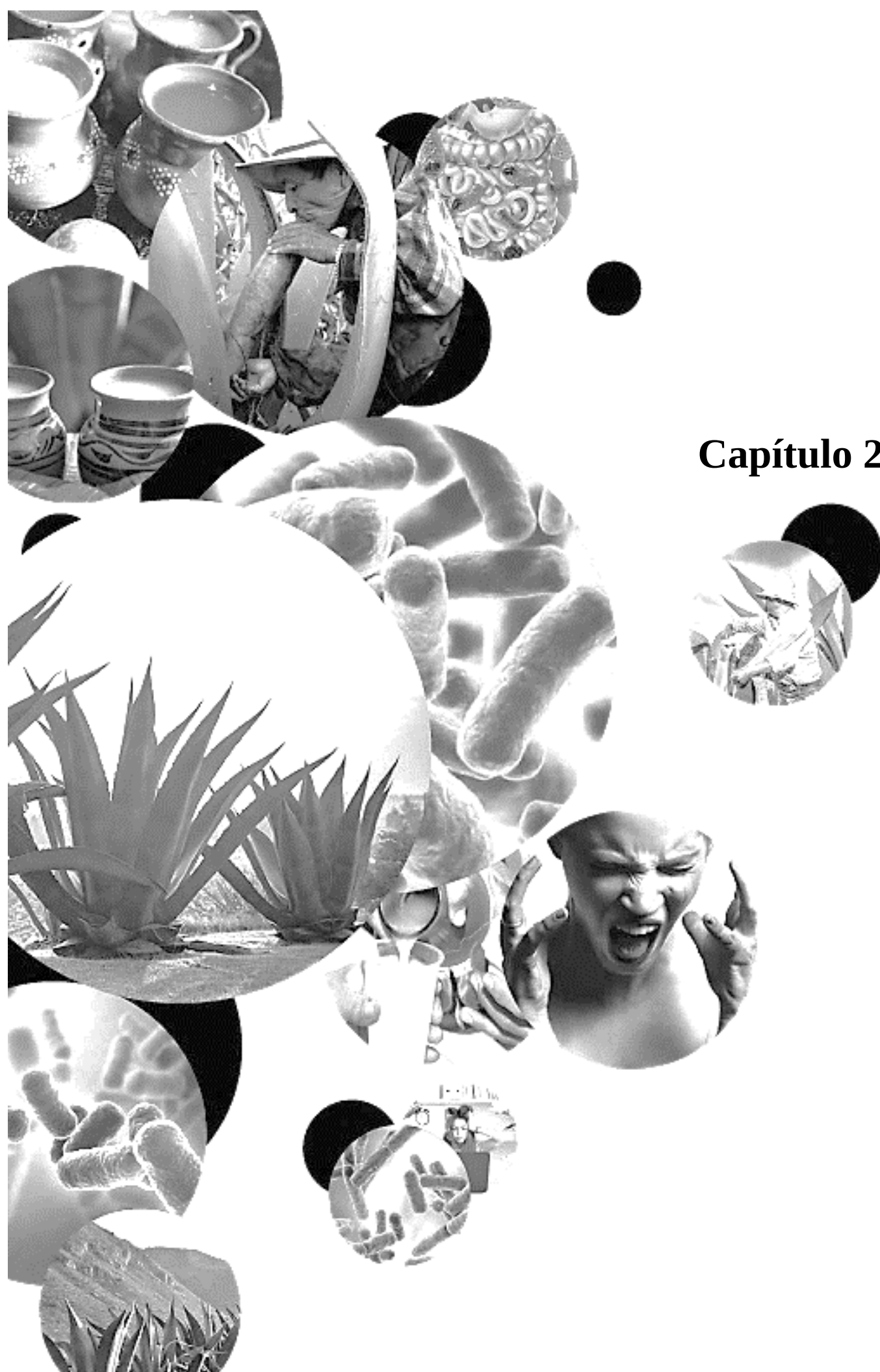
1.4.2 Objetivos específicos

1. Elaborar una bebida simbiótica a través de la utilización de aguamiel y microorganismos aislados del pulque para la intervención del grupo de estudio estresado.
2. Realizar una medición de estrés académico a la muestra de estudio utilizando el inventario de estrés académico SISCO para valorar la presencia de estrés.
3. Implementar la intervención con simbiótico y placebo al grupo de estudio a través de la administración diaria de las bebidas para la evaluación del impacto en la microbiota intestinal.
4. Evaluar la microbiota intestinal de las heces humanas antes y después de la intervención con la bebida simbiótica a través de la extracción de ADN bacteriano para la amplificación de regiones del gen 16S rRNA por PCR-RT.
5. Correlacionar el nivel estrés y la microbiota intestinal antes y después del tratamiento a través de la comparación de los patrones obtenidos por RT-PCR y las pruebas de estrés.

1.5 HIPÓTESIS

El consumo de la bebida simbiótica de aguamiel y probióticos del pulque tienen un efecto en los grupos bacterianos de la microbiota intestinal mexicana con estrés.

Capítulo 2



2 ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN

2.1 El estrés en los seres humanos

El término estrés fue inventado por Hans Selye en 1936, al estudiar el síndrome general de adaptación en ratas. Observó las diferentes etapas del síndrome: reacción o alarma, la adaptación y el agotamiento. Lo definió como la respuesta inespecífica del cuerpo a cualquier demanda (Hans, 1979). El término estrés proviene del latín “*stringere*” que significa apretar, aplastar, tensionar (Cohen, Gianaros y Manuck, 2016).

Actualmente el estrés se ha relacionado con presiones cotidianas, académicas, laborales, sociales generando diferentes respuestas del organismo. La retroalimentación constante de estrés define si es agudo o crónico (Longfei *et al.*, 2015). El estrés agudo es de corta duración y el crónico es de larga duración y mantiene activo al eje hipotálamo pituitario adrenal (HPA) y al sistema nervioso autónomo (SNA) (Landgraf, McCarthy y Welsh, 2014). La forma de afrontar el estrés varía de persona a persona, puede conducir a variados comportamientos, múltiples trastornos y enfermedades que afectan la salud mental y física (Sousa, N., 2016).

Las respuestas ante situaciones de estrés, producen una cascada de señales metabólicas de corto tiempo. Si son constantes, producen trastornos psicosomáticos, fisiológicos y psicológicos. Los sistemas que son susceptibles al estrés son el gastrointestinal y el sistema inmune (Konturex *et al.*, 2011). Las enfermedades que pueden desencadenar incluyen: reflujo gastroesofágico, úlcera péptica, síndrome del intestino irritable (SII), enfermedad inflamatoria del intestino y alergia a los alimentos (Bailey *et al.*, 2011). Las enfermedades basadas en el "distrés" (estrés psicológico prolongado), incluyen: infartos cardíacos, neurosis, estado de shock, depresión, psicosis severa, trastornos sexuales, adicciones y conductas antisociales. (De palma *et al.*, 2014).

2.2 Estrés, cerebro y el sistema nervioso

Se ha mostrado que si se experimenta estrés se libera cortisol y éste activa al eje hipotálamo-pituitario-adrenal (HPA) (Kim y Shin, 2018). El hipotálamo envía señales por medio de las neuronas localizadas en el núcleo paraventricular (PVN), luego activan la secreción del factor liberador de corticotropina (CRF), que a su vez desencadena la liberación de la hormona adrenocorticotrópica (ACTH), que conduce a la secreción de glucocorticoides en la corteza suprarrenal (Oligschlaeger, Yadati, Houben, Condello y Shiri-Sverdlov, 2019). Como consecuencia de esto, se liberan norepinefrina y dopamina (Lieberman *et al.*, 2015), que desencadenan señales en la *phyla* bacteriana intestinal y alteraciones a nivel neuronal (Kounturek *et al.*, 2011; Bonaz, Bazin y Pellissier, 2018). Las señales interactúan con receptores específicos en tejidos blancos del cerebro y su periferia. La circulación de los glucocorticoides amortigua la función neuroendocrina HPA y restaura el equilibrio por vía de la retroalimentación negativa (Chung *et al.*, 2011). Sin embargo, si el estímulo es constante, la señal ACTH llega a los receptores de la corteza adrenal, induciendo la síntesis de cortisol, cuya liberación prolongada causa retención de sodio y agua en los riñones, aumento de presión y flujo sanguíneo, incremento de glucosa en sangre y respuesta del sistema inmunológico deprimido (Smith y Vale, 2006).

La secreción de glucocorticoides y cortisol está relacionada la dinámica del cuerpo y el incremento depende de diferentes factores estresantes externos e internos. Si los niveles de cortisol se elevan por eustrés (estrés positivo), el organismo responde favorablemente a la demanda del cuerpo. Sin embargo, cuando el organismo está en constante señales de estrés, por periodos largos, hablamos de distrés (estrés negativo) el cual ocasiona un desorden fisiológico que se asocian con una amplia variedad de trastornos fisiológicos y de salud mental (Spencer y Deak, 2016).

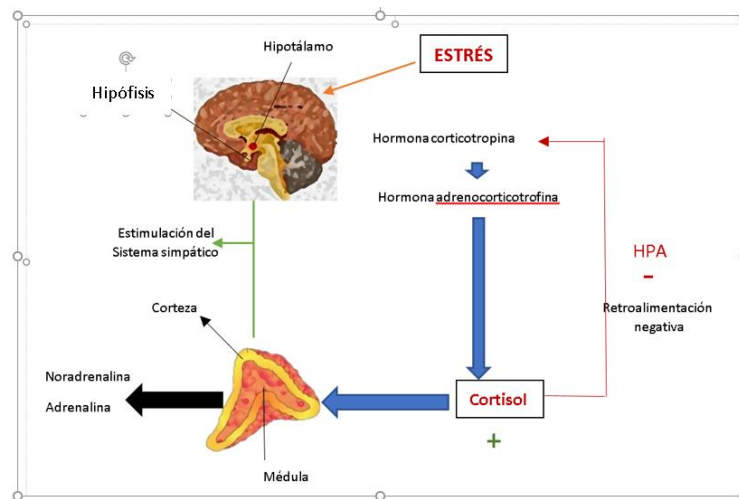


Figura 2-1. Esquema de los sistemas involucrados en la señal y respuesta de estrés.

Los niveles de cortisol en el organismo dependen del ciclo circadiano (Merlin *et al.*, 2019), exhibiendo los niveles más altos durante los 30 minutos después de despertar, disminuye gradualmente a lo largo del día, hasta alcanzar el nivel más bajo cerca de la media noche (Smith y Vale, 2006). La mayoría del cortisol en la sangre está unida a una proteína de unión de corticosteroides (CBG) y a la albúmina. Un pequeño porcentaje está libre y biológicamente activo (1-15%) (Maidana, Bruno, y Mesch, 2013). El cortisol libre llega a la saliva por medio de mecanismos intracelulares. A diferencia de los estudios de cortisol en sangre, las mediciones en orina y saliva solo detectan cortisol libre. Los niveles de cortisol en saliva no son afectados, ni por la abundancia de ésta, ni por las enzimas salivales (Merlin *et al.*, 2019).

2.3 Estrés académico

El estrés académico afecta de forma perniciosa produciendo un daño colateral a los estudiantes durante su estancia en la universidad y lo hace a diferentes niveles. Genera alteraciones a nivel físico, psicológico, fisiológico y conductual. Reduce la capacidad y el desarrollo sano dentro de los centros educativos. Además, disminuye los beneficios otórganos por la educación superior (Rentala, Nayak, Patil, Hegde, y Aladakatti, 2019).

El estrés en la vida estudiantil es sumatorio. En México pasamos casi la mitad de nuestra vida en el ambiente escolar. A partir de los 2 años de edad, las personas cursan un año de maternal o estimulación temprana, tres de preescolar, seis de educación primaria, tres de secundaria, tres de preparatoria y cinco de carrera profesional. En ocasiones se agregan cuatro más de

maestría, cuatro de doctorado y cuatro de postdoctorado. Durante las diferentes etapas de estudios se está sometido a muchos estresores como: la adaptación al modelo escolar, edad, género, cumplimiento de fechas de entrega y el nivel socioeconómico. Adicionalmente, la presión social, exámenes, expectativas de los padres y de la sociedad, prácticas profesionales, expectativas propias del estudiante, integración en la sociedad adulta y cambios fisiológicos. Además, la falta de tiempo libre, los problemas con la pareja, aspiraciones por estudios más altos, presión por los iguales, vivir en residencias estudiantiles y el estado general de salud (Gupta, Choudhury, Das, Mondol y Pradhan, 2015).

Los factores estresantes se diversifican dependiendo de la carrera elegida. Una investigación mostró que los estudiantes nuevos de medicina caen bajo factores únicos de estrés, que van desde la carga descomunal de trabajo y la ética de conflictos, hasta la exposición al sufrimiento humano y la muerte. Esto puede conducir a problemas de rendimiento académico, cinismo, falta de honradez académica, el abuso de sustancias e incluso el suicidio (Dyrbye *et al.*, 2011).

En otro estudio, realizado por la Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas, se midieron los niveles de estrés de los estudiantes de las facultades de medicina, derecho y psicología, donde se encontró que los estudiantes de medicina tuvieron el nivel más alto comparados con las otras facultades (De la Rosa *et al.*, 2015). Las principales causas de los episodios altos de estrés fueron: sobrecarga académica, poco tiempo para cumplir la carga de trabajo, exámenes y las tareas generando variados grados de estrés (Pozos *et al.*, 2016).

Es importante señalar que los estudiantes son sometidos a la indefensión, produciéndose una falta generalizada de energía, que a su vez los puede inducir al consumo de importantes cantidades de carbohidratos y causar malos hábitos alimenticios cuya consecuencia final pueden ser enfermedades como la obesidad (Hosseinkhani, Nedjat, Hassanabadi, y Parsaeian, 2019).

Actualmente, hay un ambiente muy competitivo con ritmos acelerados para la supervivencia estudiantil dentro de la carrera y un altísimo nivel intelectual para ingresar al mundo laboral. Los niveles de estrés son directamente proporcionales a la cantidad de responsabilidades y al sentimiento de frustración cuando las expectativas no son alcanzadas en tiempo y forma. Esto puede conducir a los estudiantes a problemas digestivos como el síndrome del intestino

irritable (SII), un trastorno funcional digestivo que se caracteriza por el dolor abdominal y alteraciones en el hábito deposicional (Pozos, Preciado, Plascencia, Morales y Valdez, 2018).

Otro estudio reportó que más del 80% de los estudiantes de medicina sufren al menos una forma de angustia, mientras que el 50% está sujeto a tres formas de angustia que incluyen agotamiento, baja calidad de vida, depresión y estrés, que los conduce al consumo de alcohol y drogas, o, en casos extremos, al suicidio (Dyrbye *et al.*, 2011). Sin embargo, un estudio independiente demostró que la combinación del consumo de alcohol, tabaco y el uso de internet no estaban vinculados con los niveles de estrés y cortisol, comparados de forma aislada o en conjunto (Bibbey, Phillips, Ginty, y Carroll, 2015).

2.3.1 Trastornos y enfermedades asociadas con el estrés académico

Los factores estresantes causados por el entorno escolar pueden desencadenar diferentes manifestaciones fisiológicas y psicológicas que, cuando interactúan entre sí, crean un círculo vicioso donde los pensamientos, las emociones y el comportamiento son cada vez más negativos

El estrés académico tiene efectos detrimentales sobre el bienestar de los estudiantes provocando problemas de concentración y memoria, fatiga crónica, somnolencia, dolores de cabeza, temblores musculares, ansiedad y depresión (Pozos *et al.*, 2016). Además, puede genera signos y síntomas relacionados con el sistema gastrointestinal, como dolor abdominal, diarrea, náuseas, pérdida del apetito, estreñimiento, flatulencias, distensión o hinchazón, todos relacionados con el Síndrome del Intestino Irritable (SII) (Pozos *et al.*, 2018). El estrés acumulado también puede conducir a otros trastornos y enfermedades como se puede ver en la tabla 1.

Tabla 2-1. Trastornos y alteraciones de estudiantes por estrés

Trastorno y enfermedad	Autor
Depresión	Lazarevich <i>et al.</i> , 2018.
Psicosis severa	Ered, Cooper y Ellman, 2018.
Síndrome de intestino irritable (SII)	Portincasa, Bonfrate, de Bari, Lembo y Ballou, 2017.
Dismotilidad intestinal	Chang, El-Zaatari y Kao, 2014.
Insomnio	Średniawa <i>et al.</i> , 2019.
Tabaquismo	Fujita y Maki, 2018.

Obesidad	Nakanishi <i>et al.</i> , 2018.
Ansiedad	Pidgeon, McGrath, Magya, Stapleton, y Lo, 2014.
Abuso de sustancias	Tavolacci <i>et al.</i> , 2013.
Desordenes de Músculo esqueléticos (MSDs)	Tantawy, Abdul, y Abdul, 2017.
Sistema inmune	Maydych <i>et al.</i> , 2017.
Pérdida de la memoria	Allen, Dinan, Clarke, y Cryan, 2017.
Trastornos gastrointestinales	De Palma <i>et al.</i> , 2014.

2.4 Probióticos, prebióticos, posbióticos y simbióticos

Recientemente muchos microorganismos son utilizados para la preparación de probióticos. Si un probiótico se combina con prebióticas-sustancias no digeridas por el intestino humano resulta en un simbiótico capaz de tener una actividad en la microbiota intestinal (Hamasalm, 2016). Los postbióticos son productos bacterianos no viables o subproductos metabólicos de microorganismos probióticos que tienen actividad biológica en el huésped, (Patel y Denning, 2013), pueden ser probióticos muertos por calor, bacteriocinas, ácidos orgánicos, etanol, diacetilo, acetaldehídos y peróxido de hidrógeno (Islam, 2016)

George et al., realizó una recopilación de diferentes estudios de los microorganismos usados como probióticos y el acompañamiento del prebiótico los cuales se muestran en la tabla 2 (George, Patra, Gouda, Park, Shin, y Das., 2018)

Tabla 2-2. Los microorganismos usados como probióticos y nutrientes prebióticos

Probiótico	Especie	Prebióticos
<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. crispatus</i> , <i>L. gasseri</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L. bulgaricus</i>	Fructooligosacáridos Inulina
<i>Propionibacterium</i>	<i>P. jensenii</i> , <i>P. freudenreichii</i>	Isomaltoligosacáridos
<i>Peptostreptococcus</i>	<i>P. productus</i>	Xilooligosacáridos
<i>Bacillus</i>	<i>B. coagulans</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>B. laterosporus</i>	Galactooligosacáridos Fructooligosacáridos
<i>Lactococcus</i>	<i>L. lactis</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. curvatus</i> , <i>L. plantarum</i>	Oligosacáridos de arabinoxilano y arabinosilano
<i>Enterococcus</i>	<i>E. faecium</i>	Almidón-1,2,3,4 resistente
<i>Pediococcus</i>	<i>P. acidilactici</i> , <i>P. pentosaceus</i>	
<i>Streptococcus</i>	<i>S. sanguis</i> , <i>S. oralis</i> , <i>S. mitis</i> , <i>S. thermophilus</i> , <i>S. salivarius</i>	
<i>Bifidobacterium</i>	<i>B. longum</i> , <i>B. catenulatum</i> , <i>B. breve</i> , <i>B. animalis</i> , <i>B. bifidum</i>	
<i>Bacteroides</i>	<i>B. uniformis</i>	
<i>Akkermansia</i>	<i>A. muciniphila</i>	
<i>Saccharomyces</i>	<i>S. boulardii</i>	

Los estudios que se han realizados utilizando probióticos, prebióticos y simbióticos para el tratamiento de diferentes trastornos o enfermedades han variado. En la tabla 2 mostramos algunos ejemplos.

2.4.1 Intervención con simbióticos, probióticos y prebióticos en estudiantes con estrés académico

Las estrategias para afrontar las reacciones causadas por el estrés académico son diversas. Los alimentos simbióticos recientemente se han convertido en una alternativa que puede ayudar en algunos trastornos ocasionados por el estrés. Los -“simbióticos” son productos que contienen probióticos y prebióticos (Olviera y González 2016). La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) mencionan que el término -“probiótico”- se refiere a microorganismos vivos que, cuando son administrados en cantidad adecuada, ejercen un efecto beneficioso sobre la salud del huésped (FAO y OMS, 2006. p41). El término -“prebióticos” - se refieren a ingredientes fermentados selectivamente, que dan lugar a cambios específicos en la composición y/o la actividad de la microbiota gastrointestinal, confiriendo así beneficios a la salud del huésped (FAO y WHO, 2002. p8). Por ejemplo, numerosos informes científicos confirman su efecto positivo en pacientes con obesidad (Krumbeck et al., 2018), diabetes tipo 2 (Shakeri et al., 214), síndrome del intestino irritable (SII) (Rogha, Esfahani, y Zargarzadeh, 2014). enfermedad de hígado graso no alcohólico (Sayari, Neishaboori, Jameshorani, 2018), estrés oxidativo (Kleniewska y Pawliczak, 2017), entre otros que mostramos en la tabla 2 a continuación:

Tabla 2-3 Meta-análisis del uso sobre el consumo de probióticos y simbióticos en la salud humana

Producto	Personas expuestas en el experimento	Microorganismo s utilizados	Efectos benéficos en la salud	Tiempo de administración	Dosis administrada	Referencias
<i>Sistema inmune/sepsis /estrés oxidativo</i>						
Probióticos	29 pacientes con síndrome de respuesta inflamatoria sistémica	<i>Bifidobacterium breve</i> <i>Lactobacillus casei</i>	Menor complicación de diarrea durante UCI y reducción de infecciones en pacientes con sepsis	3 días	3 g / día UFC 10g/día UFC	Shimizu et al.,2018.
Simbiótico	58 jóvenes entre 18 -35 años y 54 adultos entre 60-85 años	<i>Bifidobacterium longum</i> bv. <i>infantis</i> + GOS	Sin efecto en la respuesta inmune	8 semanas	10 ⁹ UFC en 1 g de leche en polvo + 8g día	Enani et al.,2017.
Simbiótico	58 jóvenes y 54 adultos mayores	<i>B. longum</i> , y GOS	Sin efecto en células natural killer	8 semanas	En 1 g de leche desnatada 10 ⁹ UFC/g + 8 g de prebiótico al día	Przemaska, et al; 2018.

Simbiótico	32 voluntarios sanos	<i>Lactobacillus casei</i> e inulina	Protegen al cuerpo humano del daño del estrés oxidativo. Disminución en niveles de MDA y H2O2	7 semanas	cápsula con 4 x 10 ⁸ UFC liofilizados + 400 mg de inulina	Klenieska and Pawlizcak; 2017.
Obesidad						
Simbiótico	Hombres y mujeres entre 16-65 años obesos	Vivinal GOS powder <i>B. adolescentis</i> <i>B. animalis</i>	Mejoraron los marcadores de permeabilidad intestinal	12 semanas	6.9 g /día + .1g /día	Krumbeck <i>et al</i> ; 2018.
Simbiótico	Ratones de 5 semanas	<i>Lactobacillus sakei</i> , <i>Leuconostoc kimchii</i> y alulosa	Menor ganancia de peso. Disminución de triglicéridos y colesterol LDL. Disminución de adiposidad, niveles de lípidos y citocinas proinflamatorias.	12 semanas	10 ⁹ UFC/ml y alulosa al 3 %	Ra Choi <i>et al</i> ; 2018.
Enfermedades gastrointestinales/cambios en microbiota intestinal						
Simbiótico	85 participantes constipados de 18 a 65 años de edad	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Bifidobacterium lactis</i> , e inulina-oligofructosa	Mejora en la frecuencia de defecación y síntomas de constipación	16 semanas	Bolsa de 2.5 g/día con 10 ⁹ UFC/ml	Jye <i>et al.</i> , 2018.
Simbiótico	11 bebés recién nacidos	<i>Lactobacillus plantarum</i> + FOS	Cambios en la microbiota intestinal e incremento de bacterias gram positivas	7 días	Simbiótico disuelto en dosis de 2 ml de solución salina, 7 dosis orales al día	Chandel <i>et al</i> , 2018
Simbiótico	20 personas sanas entre 18-65 años	Mezcla de <i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>B. lactis</i> , <i>B. lactis</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. salivarius</i> (W24) and <i>Lactococcus lactis</i> + FOS	No hubo efecto en la permeabilidad intestinal, sólo ocasionó mayor defecación	14 días	1.5 x 10 ¹⁰ UFC/g cepa + 10 g	Willms <i>et al.</i> , 2016
Simbiótico	60 sujetos con pocas defecaciones al día	<i>Bifidobacterium lactis</i> Inulina	Aumentaron la cantidad de bifidobacterias en el intestino	12 semanas	Bebida simbiótica de 2g/100g inulina + (1 x 1 x 10 ¹⁰ UFC/ml)	Anzawa <i>et al</i> ; 2018
Enfermedades hepáticas/ renales						
Simbiótico	140 pacientes con NAFLD entre 18 y 60 años de edad	10 ⁹ de <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Lactobacillus rhamnosus</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus bulgaricus</i> , <i>Bifidobacterium breve</i> , <i>Bifidobacterium longum</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> . Prebiótico FOS	Mejora significativa en enzimas hepáticas; disminución de AST, colesterol LDL y glucosa en ayunas	16 semanas	1 cápsula de 50 mg de simbiótico por día	Sayari, Neishaboori and Jameshorani; 2018
Simbiótico	69 pacientes con enfermedad crónica en etapa 4-5	Inulina, FOS, GOS. 9 cepas del género <i>Lactobacillus</i> y	Incremento de la albúmina. Disminución de concentraciones séricas de PCS.	6 semanas	7.5 g prebiótico y una cápsula de probiótico con 45 billones de UFC	Rossi <i>et al</i> ; 2016

		<i>Bifidobacterium</i> y <i>Streptococcus</i> .				
Enfermedades ginecológicas						
Simbiótico	60 mujeres con SOP de 18-40 años	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus casei</i> and <i>Bifidobacterium bifidum</i> Inulina	Aumento significativo de la globulina sérica de unión a hormonas sexuales. Reducción de niveles de insulina en suero. Aumento del óxido nítrico. Efecto benéfico en proteína C reactiva	12 semanas	2×10^9 UFC /g cada cepa más .8g inulina	Nasri, <i>et al.</i> , 2018
Diabetes/ Enfermedades coronaria/ Enfermedades reumáticas						
Simbiótico	27 personas con AR	<i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Lactobacillus casei</i> and <i>Bifidobacterium bifidum</i> Inulina	Reducción de PCR, elevación de los niveles plasmáticos, reducción de plasma GSH e insulina	8 semanas	cápsulas con 2×10^9 UFC /g cada cepa más 800 mg inulina	Zamani <i>et al</i> ; 2017
Simbiótico	81 adultos con diabetes entre 35-70 años	<i>Lactobacillus sporogenes</i> Inulina	Disminuyó niveles de MDA, aumentó significativamente niveles de plasma	8 semanas	panes con 1×10^8 UFC/g + .07 g de inulina	Bahmani <i>et al</i> ; 2015
Simbiótico	60 pacientes con DG	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Bifidobacterium bifidum</i> Inulina	Disminución de proteína C reactiva. Disminución en tasa de cesáreas, recién nacidos hiperbilirrubinemia y hospitalización de recién nacidos.	6 semanas	1×10^9 UFC/g +800 mg inulina	Karamali <i>et al</i> ; 2017
Simbiótico	51 pacientes con Diabetes Mellitus tipo 2	<i>Lactobacillus sporogenes</i> e inulina	Efectos benéficos en metabolismo de la insulina (triglicéridos y colesterol). Incremento del GSH	6 semanas	Alimento betacaroteno fortificado con probiótico (1×10^7 UFC/g) + 0.1 g inulina	Asemi <i>et al</i> ; 2015

Abreviaciones: UFC: Unidades formadoras de colonias / FOS: Fructooligosacáridos / LDL:lipoproteínas de baja densidad / AST: Aspartato transaminasas / UCI: Unidades de cuidados intensivos /NAFLD: Enfermedad de hígado graso no alcohólico / SOP: Síndrome de ovario poliquístico / GOS: galactooligosacáridos/ MDA:malondialdehído/ AR: Artritis reumatoide / GSH: glutatión / OSA: evaluación Oguri-Shirakawa-Azumi /PCS:p-cresilo sulfato/

Las consecuencias del estrés en los estudiantes mexicanos requieren de una propuesta que enfrente y ayude a mitigar sus efectos. Se han realizado diferentes investigaciones con preparaciones utilizando cepas probióticas únicas o multiespecie, como se muestra en la tabla 3.

Tabla 2-4. Intervenciones con probióticos, prebióticos y simbióticos en individuos con estrés.

Enfermedad o trastorno	Producto	Sujetos tratados	Probióticos	Prebiótico	Efectos benéficos en la salud	Tiempo de administración	Dosis administrada	Referencias
Insomnio (Japón)	Para-psicobiótico CP2305	33 estudiantes de medicina ambos sexos (18 -34 años)	<i>Lactobacillus gasseri</i> CP2305 1×10^{10} células	Leche fermentada CP2305 Azúcar granulada en polvo Estabilizador Lactato Citrato de sodio Sabor yogur Agua	Efecto favorable en los síntomas físicos y la calidad de sueño asociados al estrés	5 semanas	190 g	Nishida <i>et al</i> ; 2017
Ansiedad, depresión, estrés y microbiota intestinal (Japón)	Simbiótico	29 estudiantes de medicina ambos sexos	<i>Lactobacillus gasseri</i> CP2305 1×10^{10} células bacterianas	Leche fermentada CP2305 maltosa, dextrina, almidón, activada por calor.	Mejora los síntomas asociados al estrés (ansiedad y depresión), mejora la calidad de sueño. Aumento de <i>Bifidobacterias</i> y reducción de <i>Streptococos</i>	24 semanas	2 tabletas	Nishida <i>et al</i> ; 2019
Estrés (Japón)	Probiótico	23 hombres y mujeres (<30 años)	<i>L. casei cepa Shiota YIT 9029</i> 1.0×10^{11} UFC	Leche fermentada	Disminución de disfunción abdominal, dolor abdominal, sentimientos de estrés, reducción de cortisol. Reducción de la familia Bacteroidacea e y aumento de la diversidad de especies en la microbiota intestinal.	8 semanas	100 ml	Kato-Kataoka <i>et al</i> ; 2016
Estrés (Japón)	Probiótico	25 sujetos hombres y mujeres (<30 años)	<i>Lactobacillus casei shirota YIT 9029</i> 1×10^9 UFC/ml	Leche fermentada LcS	Efecto benéfico para prevenir los síntomas abdominales y de resfriado comunes y para mantener la calidad de vida en	8 semanas	100 ml	Kato-Kataoka <i>et al</i> ; 2016

					sujetos expuestos a estresores			
Estrés (Japón)	Probióticos	49 estudiantes de medicina de 4° grado	<i>Lactobacillus casei shirota</i> 1×10^9 UFC/ml	Leche fermentada	Mejora la calidad de sueño de acuerdo al análisis OSA. Alta calidad de sueño durante estrés académico	11 semanas	100 ml	Takada <i>et al</i> ; 2017 ⁴⁷
Estrés (Japón)	Probióticos	70 estudiantes de medicina	<i>Lactobacillus casei shirota</i> 1×10^9 UFC/ml	Leche fermentada	Reducción de cortisol, disminución de molestias abdominales, y gripe por el estrés. Puede controlar el HPA en ratas.	8 semanas	100 ml	Takada <i>et al</i> ; 2016 ⁴⁸
Estrés (Francia)	Probióticos	219 voluntarios sanos (18 a 70 años)	<i>Lactobacillus gasseri PA</i> , <i>Bifidobacterium bifidum</i> MF, <i>Bifidobacterium longum</i> SP		Disminución del estrés y fatiga	32 días	100 mg	Allaert, Courau and Foresteir; 2016
Estrés (EU)	Probiótico	Estudiantes de pregrado: $n=145$ para <i>L. helveticus</i> R0052, $n=142$ para <i>B. bifidum</i> R007, $n=147$ para <i>B. infantis</i> R0033	<i>Bifidobacterium longum</i> ssp. <i>Infantis</i> R0033, <i>Bifidobacterium bifidum</i> R0071 y <i>Lactobacillus helveticus</i> R0052 3×10^9 UFC		Mejoras en los síntomas de diarrea, estreñimiento y dolor abdominal.	6 semanas	-	Culpepper <i>et al</i> ; 2016
Estrés oxidativo (Irán)	Simbiótico	30 mujeres con SOP (18-40 años)	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus casei</i> and <i>Bifidobacterium bifidum</i> 2×10^9 UFC/gr	Inulina	Aumento significativo de la globulina sérica de unión a hormonas sexuales. Reducción de niveles de insulina en suero. Aumento del óxido nítrico. Efecto	12 semanas	-	Nasri, <i>et al.</i> , 2018

					benéfico en proteína C reactiva			
Obesidad (Irán)	Simbiótico	30 hombres y 20 mujeres	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Bifidobacterium bifidum</i> 2×10^9 UFC	Inulina	Disminución en el peso corporal, estrés, ansiedad	8 semanas	500 mg	Hadi et al.,2019 ⁵²
Enfermedad hepática grasa no alcohólica (Irán)	Simbiótico	50 hombres y 52 mujeres (40 años de edad)	<i>Bifidobacterium animalis subsp. Lactis</i> 1×10^8 UFC	Inulina	Mejóro la esteatosis hepática y las concentraciones de enzimas hepáticas en pacientes con NAFLD.	24 semanas	-	Bakhshimoghaddam et al.,2018 ⁵³
Estrés Oxidativo (Polonia)	Simbiótico	32 voluntarios sanos (20 -35 años de edad)	<i>Lactobacillus casei</i> 4×10^8 UFC	Inulina	Disminución en niveles de MDA y H ₂ O ₂	7 semanas	400 mg	Klenieska and Pawlizcak; 2017
Estrés oxidativo (Polonia)	Simbiótico	16 hombre y 16 mujeres /20 a 35 años de edad)	<i>Lactobacillus casei</i> 4×10^8 UFC	Inulina	Disminución en las concentraciones de 4-hidroxiacetaldehído (HNE) y 8-isoprostano en el plasma humano y mayor actividad de enzimas antioxidantes.	7 semanas	400 mg	Klenieska and Pawlizcak; 2018
Obesidad (EU)	Simbiótico	Hombres y mujeres (16-65 años)	<i>B. adolescentis</i> <i>B. animalis</i> 1×10^9 UFC	Inulina	Mejoraron los marcadores de permeabilidad intestinal	12 semanas	7 gr	Krumbeck et al; 2018 ⁵⁶

Abreviaciones: UFC: Unidades formadoras de colonias /LCS: *Lactobacillus casei shirota*/ HPA: Eje hipotálamo pituitaria adrenal /NAFLD: Enfermedad de hígado graso no alcohólico / GOS: galactooligosacáridos/ MDA:malondialdehído/ HNE: 4-hidroxiacetaldehído/OSA: Evaluación Oguri-Shirakawa-Azumi /

2.5. Pulque, aguamiel, agave y sus probióticos

El pulque es la bebida tradicional mexicana que los aztecas la nombraron como metoctli (del idioma náhuatl metl = agave o maguey, y octli = vino) vino de agave, o iztacoctli (de izac = blanco y octli = vino) vino blanco, o poliuhquioctli (de poliuhqui = spoile do rrotted y octli =

vino) (Escalante et al., 2016). El pulque es una bebida que resulta de la savia llamada aguamiel obtenida de varias especies de maguey (*Agave atrovensis*, *A. americana* L., *A. atrovirens* var. *Salmiana*, *A. mapisaga* Trel, *A. salmiana* var. *angustifolia* A. Berger, *A. salmiana* var. *ferox*, *A. salamina* var. *salmiana*) (Escalante et al., 2016). La microbiota del maguey fermenta los azúcares del aguamiel de agave, dando las características fisicoquímicas del pulque, de color blanco, viscoso, sabor ácido, pH entre 3.7 a 4.2. Tiene un nivel reducido de alcohol, con grado entre 4 y 7° GL. (Secretaría de Economía, 1972b; Escalante et al., 2004).

La diversidad de microorganismos homofermentativos y heterofermentativos que se encuentran en el pulque son: Bacterias productoras de ácido (bacterias ácido lácticas (60-85%) y bacterias ácido acético), microorganismos productores de alcohol (*S. cerevisiae* y *Z. mobilis*), bacterias productoras de dextrano (*L. mesenteroides* 0.5-25%) y microorganismos putrefactores (Escalante et al., 2016). En investigaciones recientes las bacterias ácido lácticas provenientes de otras fuentes se ha comprobado que tienen un efecto benéfico en la salud de las personas (ver tabla 2). Por lo tanto, las especies de *Lactobacilos* que contienen el pulque, pudieran ser utilizadas para la formulación de bebidas probióticas como tratamientos en personas con diferentes patologías por su actividad antagónica de algunas bacterias y hongos patógenos (Torres-Maravilla et al., 2016). Existe antecedentes de que el consumo del pulque se dio como tratamiento contra el escorbuto en una prisión de la ciudad de Puebla en el año 1887 (Escalante et al., 2016)

También lo consumía un los grupos de indígenas Otomíes del Valle del Mezquital en el año 1946 donde verificaron que el consumir 2 litros de pulque por una semana aportaba calorías (12 %), proteína total (6 %), tiamina (10 %), riboflavina (24 %), niacina (23 %), vitamina C (48 %), calcio (8 %) y hierro no asociado a la hemoglobina (51 %), de la ingesta recomendada (Vázquez, 2019; Escalante et al., 2016). Además, las bacterias *Leuconostoc citreum*, *L. kimchi*, *L. mesenteroides* y *Lactobacillus acidophilus* del pulque se encontró una influencia en reducir los trastornos gastrointestinales (Escalante et al., 2004, 2008).

2.5.1. Aguamiel y prebióticos

El aguamiel es la savia extraída del agave, de sabor dulce, líquido translúcido, de color ámbar claro, de sabor fresco y ligeramente ácido con sabor y olor característicos (Escalante et al., 2008). La extracción la realiza el tlaquichero por inducción y raspado usando un acocote

(calabaza seca) (Jennings *et al.*, 2005; Escalante *et al.*, 2008). El aguamiel contiene una gran diversidad de LAB como: *Lactobacillus* y *Leuconostoc* (Escalante *et al.* 2004). Las bacterias identificadas inicialmente como más abundantes fueron *L. citreum* y *L. kimchii* y las menor cantidad *Lactococcus lactis*. La γ -Proteobacteria *Erwinia rapontici*, *Enterobacter sp.* y *Acinetobacter radioresistens* fueron el segundo grupo bacteriano más abundante detectado en la savia de agave. (Escalante *et al.* 2008). La planta de agave madura puede producir de 4-6 L de aguamiel incluso logra alcanzar 1000 L en su vida útil de producción (Jennings *et al.*, 2005).

La biodiversidad de microorganismos presentes en el aguamiel se debe a sus importantes cantidades de azúcares fermentables (fructosa) y fibra no soluble (inulina). La inulina está constituida por moléculas de fructosa unidas por enlace B-(2-1) fructosil-fructosa, denominándolos como fructanos, estos no pueden ser hidrolizados por las enzimas digestivas humanas, pasan intactos hasta ser hidrolizados y fermentados por las bacterias del tracto inferior gastrointestinal, comportándose como fibra dietética, los fructanos aportan un valor calórico de 1.5 kcal/g. Además de ser ricos en fósforo, vitamina C, magnesio, zinc, cobre, calcio y azúcares reductores. El aguamiel y el pulque son considerados de carácter nutricional. Entre los azúcares se encuentran glucosa, sacarosa, fructosa y algunas pentosas (Tovar *et al.*, 2008). Además, contiene hierro y vitaminas del complejo B (tiamina y riboflavina) (Escalante *et al.*, 2016). Otros nutrientes son los aminoácidos libres como la metionina, proteínas y el γ -aminobutírico (GABA) considerado un neurotransmisor (Ortiz-Basurto *et al.*, 2008).

La inulina y todos los carbohidratos -fructanos y fructooligosacáridos- que contiene el aguamiel puede ser considerado un potencial prebiótico. Además de su índice glucémico, absorción de calcio en embarazadas, la absorción de hierro y la prevención de cáncer (Santos-Zea *et al.*, 2016). Por lo tanto, utilizar el aguamiel como la base para la elaboración de bebidas fermentadas en forma de simbióticos puede favorecer en la salud de las personas.

2.5.2. *Agave spp.*

La planta monocárpica de agave es conocida como “maguey”, sus hojas denominadas “pencas” se encuentran alrededor. De color verde o amarillo, gruesas y terminación en punta. Se encuentra en todo el territorio mexicano. Tiene dos géneros *Littaea* y *Agave* y solo en pocos taxones se puede extraer el aguamiel. De otras especies se puede extraer el tequila y el

mezcal. Crece en zonas áridas o semiáridas. Condiciones montañosas o rocosas con una altura de 2500 msnm o planicies y zonas cercanas al nivel del mar (Guzmán-Pedraza, y Contreras-Esquivel, 2018). Las variedades de agave más utilizados para producir aguamiel y por ende el pulque son: *Agave macroculmis*, *A. mapisaga*, *A. mapisaga var. lisa*, *A. salmiana*, *A. angustifolia*, *A. ferox*, *A. salmiana subsp. crassispina* y *A. tecta* (Mora-López, Reyes-Agüero, Flores-Flores, Peña-Valdivia y Aguirre-Rivera, 2011).

2.6 La microbiota

La microbiota es el conjunto de microorganismos y virus que habitan en el humano. Los lugares donde se localizan son: la piel, en el canal auditivo, vías respiratorias altas, cavidad vaginal y la microbiota intestinal. La relación simbiótica entre la microbiota y el humano ayuda a mantener las funciones inmunológicas, metabólicas y motoras normales, la digestión y absorción de los nutrientes (Debré, 2016). La forma de nacimiento, la lactancia, el estilo de vida, la dieta, las condiciones higiénicas y ambientales, el uso de antibióticos y la vacunación pueden determinar cambios definitivos en el patrón de la microbiota (Sommer y Bäckhed, 2013).

2.6.1 La microbiota intestinal y su disbiosis

La microbiota gastrointestinal son microorganismos 10^{14} aproximadamente que viven en el tracto digestivo: bacterias, virus y algunos eucariotas. El área más colonizada del cuerpo humano es el intestino, con concentraciones bacterianas que van desde 10^1 - 10^3 células por gramo en el intestino superior a 10^{11} - 10^{12} por gramo en el colon (Derrien, y Vlieg, 2015). En el intestino delgado se encuentran 10^{11} - 10^{13} bacterias / g. El estómago y el duodeno la cantidad es menor (Passos *et al.*, 2017). Hay 50 phyla diferentes, la mayoría son dos phyla: *Firmicutes* la más abundante y *Bacteroidetes*. Otros phyla también encontrados en proporciones menores son *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Fusobacteria* y *Verrucomicrobia*. La mayoría de los microorganismos son anaerobios (Passos y Moraes-Filho, 2017).

La microbiota intestinal tiene una función de protección a nivel gastrointestinal contra daños de patógenos y factores externos (Mangiola *et al.* 2016). La microbiota intestinal va cambiando a lo largo de la vida y se mantienen estable a partir de la edad adulta. Actúa en la modulación y maduración del sistema inmunológico, promueven la conversión de

carbohidratos no digeribles en ácidos grasos de cadena corta, intervienen en el metabolismo de los ácidos biliares (De palma *et al.*, 2014).

El equilibrio de la microbiota intestinal se le conoce como eubiosis, donde hay un predominio de las bacterias benéficas (Firmicutes y Bacteroides), sin embargo, cuando los microorganismos patógenos como las *Proteobacterias* son dominantes y los microorganismo benéficos se reducen en la cantidad a nivel de grupo o phyla se conoce como disbiosis (Debré, 2016). Se ha reportado que la disbiosis puede desencadenar en diferentes patologías en el ser humano, debido a que hay una conexión entre los metabolitos que forman la microbiota intestinal enviando señales a través de la circulación a diversos órganos alterando la funciones cognitivas en el cerebro, se puede alterar el metabolismo en el hígado y el metabolismo de la glucosa en el páncreas (Korecka y Arulampalam, 2012). La disbiosis puede alterar las respuestas inflamatorias, el metabolismo, permeabilidad intestinal y motilidad digestiva, promoviendo así un estado proinflamatorio. Lo cual conduce a diferentes patologías como la diabetes, obesidad, digestivas como el síndrome del intestino irritable y la enfermedad inflamatoria intestinal. También enfermedades neurológicas, autoinmunes y neoplásicas.

2.6.2. La microbiota intestinal y el cerebro

El intestino y el cerebro se vinculan por medio la activación de las neuronas relacionadas con la motilidad intestinal, la permeabilidad intestinal, la liberación de hormonas intestinales y la función inmune a través de conexiones vagales y pélvicas entre el sistema nervioso central y el sistema nervioso entérico y los ganglios prevertebrales simpáticos (Rea, Dinan y Cryan, 2016) que envían señales para las funciones sensorial y de secreción en el cuerpo (Montiel - Castro, González - Cervantes, Bravo - Ruiseco y Pacheco - López, 2013).

Diferentes investigaciones han abordado el estudio de la comunicación entre la microbiota intestinal y el cerebro. Se ha observado que en ratones libres de gérmenes tienen una alteración en el neurodesarrollo y cambios de comportamiento como la ansiedad (Clarke *et al.*, 2012). También se ha observado que los ratones libres de gérmenes han mostrado autismo, déficits en la sociabilidad y alteración cognitiva (Desbonnet *et al.*, 2014). Otras trastornos que se han presentado como resultado de la disbiosis son: depresión (Kelly, Keane, Cryan, Clarke, y Dinan, 2019), ansiedad (De Palma *et al.*, 2017), esquizofrenia (Grochowska¹, Wojnar y Radkowski, 2018), enfermedad de Parkinson (Sampson *et al.*, 2016) Enfermedad de

Alzheimer (Minter et al., 2016), Esclerosis múltiple (EM) (Berer et al., 2017) y sintomatología del trastorno del espectro autista (TEA) (Mangiola et al., 2016). Hay un gran interés en la gran influencia en la presencia de estrés y la neuroinflamación (Rea, Dinan y Cryan, 2016). En los seres humanos se ha demostrado que después del trasplante fecal hubo un restablecimiento en trastornos gastrointestinales como el estreñimiento de tránsito lento (Ge et al., 2017) y en la depresión (Kelly et al., 2016), la ansiedad (De Palma et al., 2017) y la enfermedad de Parkinson (Sampson et al., 2016).

La microbiota intestinal se conecta con el cerebro por la vía, nervio vago (Bonaz, Bazin y Pellissier, 2018), secreción de ácidos grasos de cadena corta y de los neurotransmisores - dopamina, norepinefrina, serotonina o ácido gamma-aminobutírico (GABA)- y así evita la aparición de diferentes los trastornos (Strandwitz, 2018). La dopamina precursora de la norepinefrina y la epinefrina cuya función es de comportamiento motivado por la recompensa (Strandwitz, 2018). Se ha mostrado en estudios invitro que algunas enterobacterias como *Escherichia coli* pueden crecer en presencia de dopamina y norepinefrina (Freestone et al., 2002). También *Proteus vulgaris*, *Serratia marcescens*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus mycoides* pueden ser secretores de éstos neurotransmisores (Tsavkelova, Botvinko, Kudrin y Oleskin, 2000). Los ácidos grasos de cadena corto y triptófano regulan los niveles de serotonina que es un neurotransmisor encargado de los procesos fisiológicos como la secreción gastrointestinal y la peristalsis, la respiración, la vasoconstricción, el comportamiento y la función neurológica (Berger, Gray y Roth, 2009). La microbiota intestinal regula los niveles del ácido gamma aminobutírico (GABA) que es el principal neurotransmisor inhibidor del sistema nervioso. Involucrado en los trastornos de comportamiento, el dolor y el sueño (Wong et al., 2003), la motilidad intestinal, el vaciamiento gástrico, nocicepción y secreción ácida (Hyland y Cryan, 2010). Los *Lactobacilos* y las *Bifidobacterias* producen GABA por lo tanto la disbiosis en estos grupos puede ocasionar una alteración en la salud de las personas. (Strandwitz, 2018).

Pocos estudios han mostrado que el consumo de psibióticos a base de *Lactobacilos* o *Bacteroides* pueden tener efectos positivos en la disbiosis de la microbiota intestinal y los trastornos psiquiátricos como el estrés (Cryan y Dinan, 2012)

2.6.3. La microbiota, estrés y probióticos

Estudios preclínicos han mostrado que el estrés produce una disbiosis en la microbiota intestinal, principalmente en el colon (Moussaoui *et al*, 2017). Las muestras de heces de estudiantes universitarios, con nivel de estrés alto, evidenciaron una notable disminución de microorganismos ácido lácticos (Knowles, Nelson, Palombo.2008). En otro estudio clínico, realizado en un grupo de militares expuestos a situaciones de estrés, detectó una disminución a nivel intestinal del filo *Bacteroidetes* y un aumento del filo *Firmicutes*, acompañado de un aumento de la permeabilidad intestinal (Karl *et al.*, 2017), mientras que sujetos que padecen del síndrome de intestino irritable por estrés mostraron un aumento del filo *Proteobacteria* y *Barnesiella*, pero una disminución del filo *Firmicutes* y *Bacteroidetes* (Peter *et al.*, 2018). Además, personas en estado depresivo, que es considerado una enfermedad mental y que en muchas ocasiones se presenta en estudiantes estresados, se mostró un aumento de *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* y *Actinobacteria* y una disminución de *Firmicutes* (Jiang *et al.*2015). En investigaciones con animales, también se ha observado una disbiosis en la microbiota intestinal cuando fueron expuestos a disrupción social, por ejemplo se observó un aumento de *Clostridium* y una disminución de *Bacteroides* en ratones (Bailey *et al.*,2011], mientras que en otro estudio los ratones con estrés crónico mostraron incrementos en microorganismos como *Helicobacter*, *Peptostreptococcaceae*, *Streptococcus* y *Enterococcus faecalis* (Gao *et al.*, 2018).

Recientes investigaciones han buscado recobrar el equilibrio de la microbiota intestinal mediante alimentos simbióticos que parecen tener un efecto benéfico en la salud de las personas y las funciones neuronales del cerebro (Altveş, Yildiz y Vural, 2020).

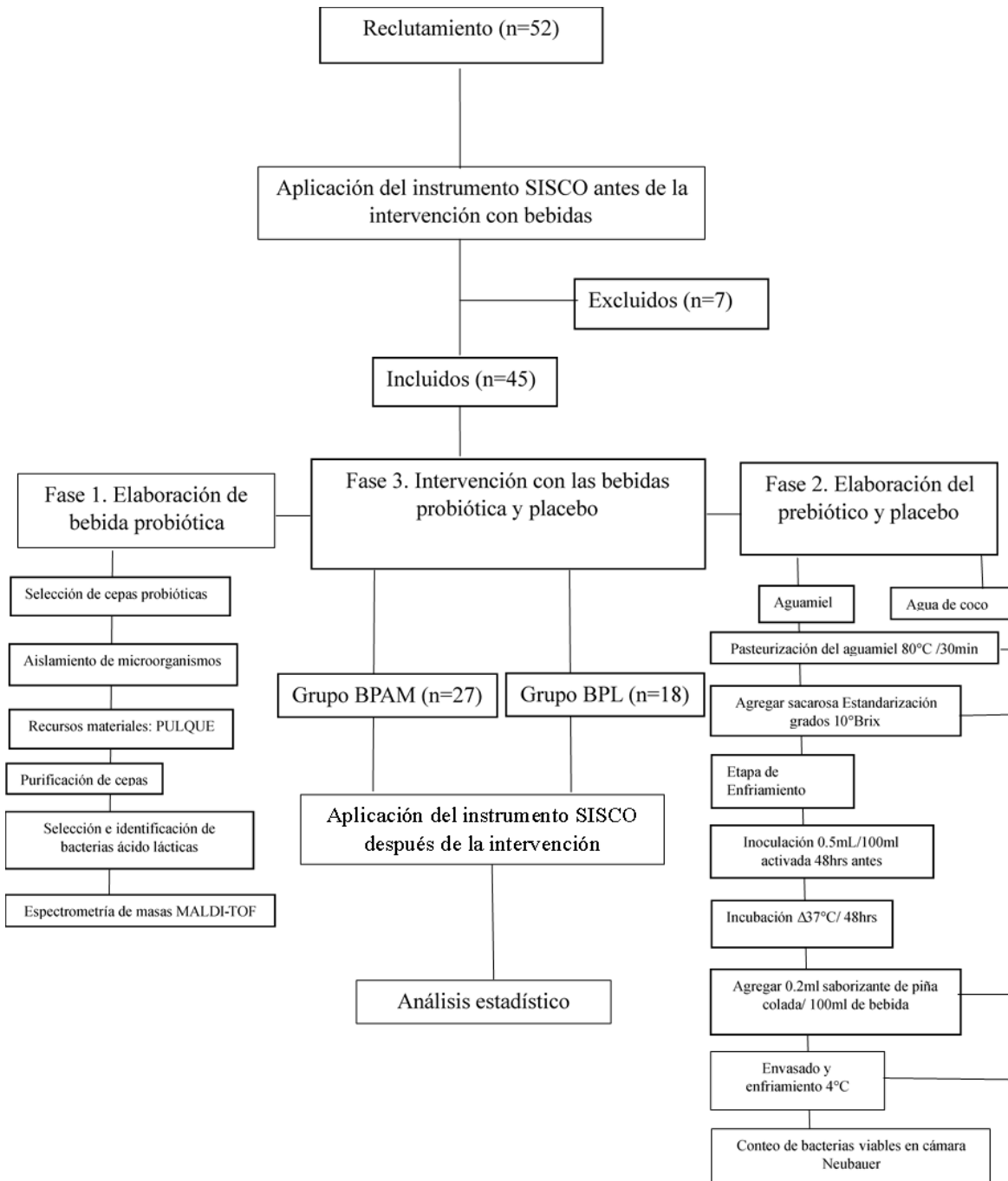
Estudios previos de intervenciones con probióticos elaborados a base de *Lactobacillos casei* Shirota han demostrado una reducción del estrés, así como efectos favorables en problemas de disfunción intestinal y cambios en la diversidad microbiana del intestino (Kato-Kataoka *et al.*, 2016). Se analizó que el consumo del simbiótico nombrado Ecologic®825, que contiene diferentes cepas de *Lactobacillos* y *Bifidobacterias*, genera cambios en la memoria emocional, el razonamiento y las tareas de toma de decisiones emocionales (Bagga *et al.*,2018], habilidades que se ven mermadas cuando se está estresado. Mientras que la calidad del sueño, los síntomas de ansiedad y depresión fueron aliviados por el uso de la cepa *Lactobacillus*

gasseri CP2305, activado por calor, en estudiantes estresados. Además, se demostró que hubo un aumento del filo de Bifidobacterias y una reducción de los estreptococos. Por otro lado, nueve cepas liofilizadas de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, en el simbiótico llamado Ecologic®Barrier, mejoran la cognición en estudiantes universitarios deprimidos, sin lograr reducir la depresión (Nishida, Sawada, Kuwano, Tanaka y Rokutan, 2019)

Hay una evidencia significativa que relaciona la microbiota intestinal y el estrés. Por lo tanto, resulta de un gran interés una línea de investigación que aporte nuevo conocimiento en la microbiota intestinal, estrés y sus posibles soluciones para restablecerla en favor de la salud de las personas.

3. METODOLOGÍA

3.1 Diseño metodológico



3.1.1 Diseño de la investigación

3.1.2 Descripción general del estudio

Se realizó un estudio controlado de tipo experimental, prospectivo, longitudinal, aleatorio y simple ciego. La metodología se dividió en cuatro fases: Fase I, se elaboró la bebida, Fase II, se desarrolló la intervención, Fase III, evaluación de nivel de estrés. Se consideró los niveles N1 y N2 poco estrés y N3, N4 y N5 alto estrés. Fase IV, se evaluó la microbiota intestinal.

El presente ensayo clínico fue aprobado por el Comité de Ética en Investigación del departamento de Ciencias de la Salud de la Universidad Popular Autónoma del estado de Puebla (CONBIOETICA21CEI00620131021) y siguió las normas sobre experimentación humana de Helsinki 1975.

3.1.3 Muestra de estudio y criterio de inclusión

La muestra fue de 52 estudiantes, hombres y mujeres entre 20 y 25 años de edad. Todos mexicanos de la carrera de medicina de la universidad privada en la ciudad de Puebla, Pue., México. La muestra se dividió en dos grupos: el grupo experimenta EXP (n=27) que consumió la bebida de agumiel fermentada con probióticos del pulque y el grupo control(n=18) que consumió la bebida placebo.

3.1.4 Criterios de exclusión y eliminación

Se excluyeron estudiantes que padecieran ansiedad, desorden bipolar, epilepsia, esquizofrenia, insomnio o cualquier otro desorden neurológico y mujeres embarazadas. También si alguno consumió alguna droga en los últimos 4 meses y que tuvieran tratamiento de antidepresivos. Se eliminaron los estudiantes que no proporcionaron la información necesaria para los instrumentos de medición y los que no terminaron el tratamiento. La participación fue voluntaria. Se firmó el consentimiento informado donde se explicó detalladamente en qué consistía el estudio. No se proporcionó ninguna compensación o ayuda económica por el estudio.

3.2. Fase I. Elaboración de la bebida de aguamiel y probióticos del pulque

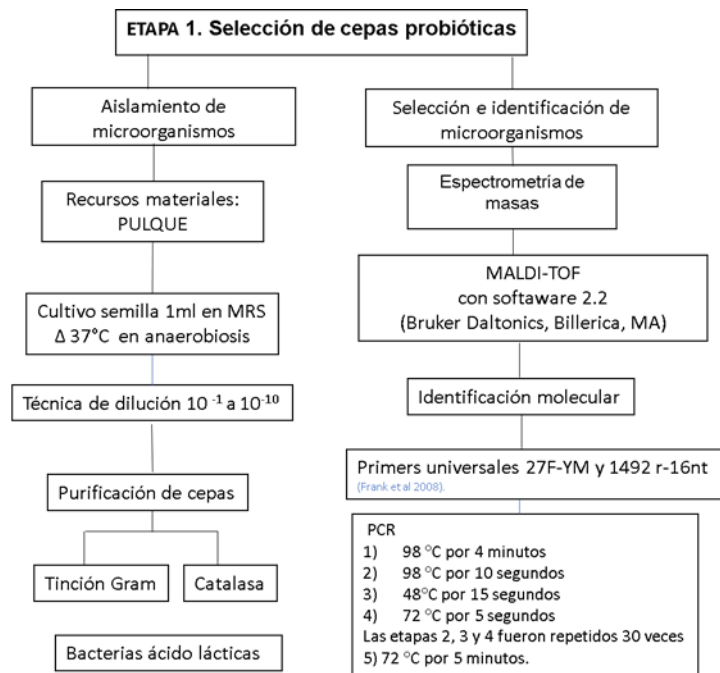


Figura 3-1 Diagrama de flujo del proceso de elaboración de bebida simbiótica.

3.2.1 Aislamiento de microorganismos a partir del pulque

Se aislaron tres microorganismos del género *Lactobacillus* a partir de muestras de Pulque. bebida adquirida en un mercado del municipio de San Pedro Cholula, Puebla, México. Se realizó un cultivo semilla, con 0.1 ml de pulque en 10 ml de MRS, Mann Rogosa Sharpe (Merk, USA), se incubó a 37°C bajo condiciones de anaerobiosis por 48 h. de MRS, se incubó a 37°C bajo condiciones de anaerobiosis por 48 h.

3.2.1.1. Selección e identificación de microorganismos

Se utilizó la técnica de dilución decimal (10^{-1} a 10^{-10}) y sembrado por estría cruzada, hasta tener cepas puras, el medio utilizado fue MRS (Arteaga-Chávez *et al.*, 2017). La purificación de las cepas se realizó en medio gelosa sangre de carnero y gelosa sangre humana. Además, se utilizaron medios de papa dextrosa y manitol para descartar algún patógeno. Una vez purificadas las cepas, se evaluaron con la tinción de Gram que fuera positiva y la prueba de catalasa que resultara negativa, para evidenciar que eran bacterias ácido lácticas. Posteriormente se realizó microscopia para observar las características morfológicas de cada bacteria.

3.2.1.2. Cuantificación de células viables

Se cuantificó el número de las unidades formadoras de colonias UFC/ml para la determinar la concentración los microorganismos viables. Se realizó diluciones seriadas de 10^{-1} hasta 10^{-10} en agua peptonada al 1% para la cinética de crecimiento y luego se cultivó en medio sólido (MRS) por extensión en placa, se incubó durante 48 horas en condiciones de anaerobiosis. Se realizó medición en espectrofotómetro para determinar la densidad de crecimiento.

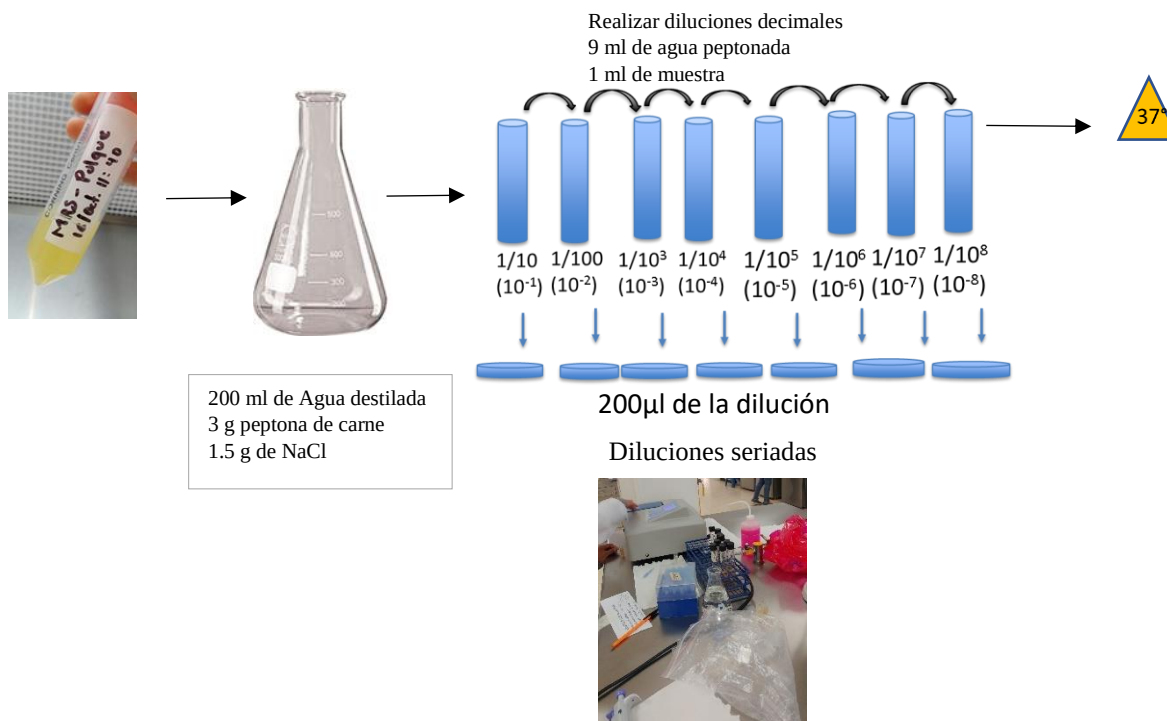
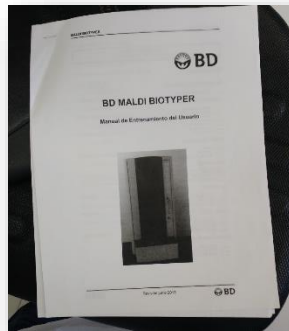


Figura 3-2 Proceso del método para cuantificar las células viables.

3.2.2. Identificación de las cepas aisladas mediante espectrometría de masas.

Las cepas seleccionadas en este estudio se identificaron por espectrometría de masas MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight), con software 2.2 (Bruker Daltonics, Billerica, MA) (Buker, Alemania). El fundamento consiste en el cálculo de tiempo de vuelo de cada fragmento de una molécula a través de un trayecto predeterminado con una ionización láser previa de la molécula en una matriz determinada. Identificación bacterias y hongos de tamaño de < 100.000 Da (macromoléculas) $2.000 - 20.000$ Da (Legarraga *et al.*, 2013)

Los pasos de la técnica MALDI-TOF que se siguieron son los siguientes:



1. Selección de la colonia aislada y purificación del microorganismo en estudio
2. Aplicación sobre en una placa de metal (para 96 muestras), de la colonia en estudio se utilizó palillos



3. Se coloca sobre el inóculo una solución de ácido alfa-ciano-4-hidroxycinámico, acetonitrilo y ácido trifluoroacético, la cual cristaliza la muestra, exponiendo las proteínas por desnaturalización de la membrana, se vaporiza.
4. Dejar secar a temperatura ambiente.
5. Se coloca la placa de metal en el contenedor del Bruker Daltonics, Billerica, MA, Alemania para la ionización por láser pulsante.



6. La ionizadas de la molécula en estudio viaja la cámara de vacío. La detección es de acuerdo a la relación masa/carga de la molécula y será el tiempo que tarde en llegar al final. Se detecta el espectro de las masas.

7. El software utilizado es de 2.2 identificó las muestras analizadas las cuales fueron comparadas automáticamente con la información que contiene para la final dar el resultado.

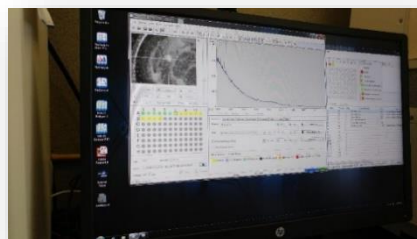


Tabla 3-1. Significado de los valores de puntuación para la identificación del género y la especie

Rango	Descripción	Símbolos
2,300...3,000	Identificación altamente probable de las especies	(+++)
2,000...2,299	Identificación segura del género, identificación probable de especies	(++)
1,700...1,999	Probable identificación del género	(+)
0,000...1,699	Identificación no confiable	(-)

Tabla 3-2. Significado de las categorías de coherencia (A-C)

Categoría	Descripción
A	Consistencia en especies: El mejor emparejamiento fue clasificado como verde. Otros alineamientos verdes son de la misma especie que el primero. Más alineamientos amarillos son al menos del mismo género que el primero.
B	Consistencia en género: El mejor alineamiento fue clasificado como verde o amarillo. Otras coincidencias de especies verdes o amarillas tienen al menos el mismo género que el primero. Las condiciones de consistencia de la especie no se cumplen en su totalidad.
C	Sin consistencia: ni especie ni consistencia de género

3.2.3. Identificación molecular de las bacterias con características de BAL.

La identificación molecular de las cepas aisladas fue realizada a través de la amplificación por PCR del gen 16S ARNr. La amplificación se hizo utilizando los primers universales 27F-YM y 1492 r-16nt (Frank et al 2008). La amplificación se realizó en un termociclador

INFINIGEN (modelo TC-96CG); las reacciones se llevaron a cabo en tubos PCR estériles de 0.2 ml que contenían un volumen final de 25 µl de la siguiente mezcla: 12.5 µl de master mix PrimeStar Max (Takara), 0.5 µl de primer mix 10 µM, 1 µl de ADN genómico (1ng) y 11 µl de agua grado biología molecular. Cada reacción fue realizada por triplicado. El programa PCR usado fue el siguiente: 1) 98 °C por 4 minutos, 2) 98 °C por 10 segundos, 3) 48°C por 15 segundos, 4) 72 °C por 5 segundos (las etapas 2, 3 y 4 fueron repetidos 30 veces), 5) 72 °C por 5 minutos. El producto amplificado fue analizado mediante un gel de agarosa al 1 % y cuantificado mediante un espectrofotómetro Genova NanoDrop (Jenway TM). Se usó un marcador de peso molecular de 1 kb pb DNA Ladder (Thermofisher). Los productos PCR obtenidos fueron purificados a partir del gel utilizando el kit PCR Clean-Up and Gel Extraction (IBI Scientific). La secuencia fue determinada por triplicado usando la técnica de secuenciación Sanger en las instalaciones del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (IBT-UNAM).

3.2.4. Cuantificación del crecimiento bacteriano

Se cuantificó el crecimiento microbiano a través de estudios cinéticos de crecimiento de 36 horas (turbidimetría). Se utilizó la técnica de dilución decimal y sembrado por estría cruzada, hasta tener cepas puras, el medio utilizado fue MRS (Arteaga-Chávez, 2017). Las cinéticas de crecimiento de las cepas identificadas LPL, LPR y LBR se realizaron por separado y en consorcio. Las mediciones fueron realizadas por triplicado con intervalos de dos horas, utilizando un espectrofotómetro UV visible (modelo 4255, Zuzi) y determinando la absorbancia a 560 nm. El cultivo se hizo en un volumen de 10 ml del medio MRS (Difco TM Lactobacilli, Becton Dickinson de México), con incubación a 37°C bajo agitación a 200 rpm en condiciones de anaerobiosis. Se tomaron mediciones desde la hora 0 hasta la hora 36.

Se utilizó la fórmula la siguiente fórmula: $\text{UFC/ml} = \text{número de colonia por placa} * \text{el factor de dilución} / \text{ml de muestra sembrada}$.

3.3. FASE II. Elaboración de la bebida de aguamiel fermentada con probióticos del pulque

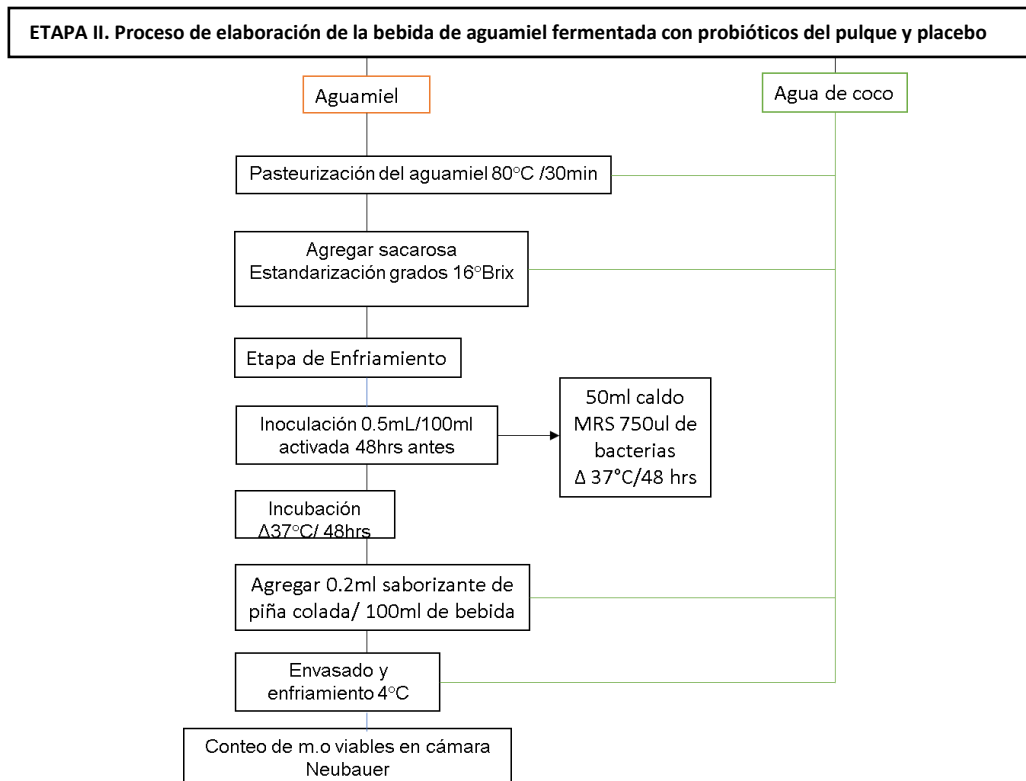


Figura 3-3 Diagrama de flujo del proceso de elaboración de bebida simbiótica.

El Aguamiel se pasteurizó a 80°C durante 30 min y se adicionó sacarosa para ajustar su contenido a 10°Brix. Cuando la bebida estaba a temperatura ambiente se agregó el inóculo bacteriano con *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paracasei* y *Lactobacillus brevis* a una concentración del 1% con una D.O. λ_{600nm} entre 0.6-0.8, posteriormente se fermentó por 14 horas. La bebida debe alcanzar una concentración de probióticos de 3×10^8 ufc/mL. Se adicionó 0.5mL po cada 100mL de bebida de aguamiel. El envasado se realizó en condiciones de esterilidad usando envases previamente pasteurizados y su conservación a 4°C.

3.3.4. Elaboración de la bebida placebo

La bebida placebo fue elaborada a base de agua de coco y saborizante (COCO DREAM®). Su proceso de elaboración consistió en pasteurizar el agua de coco a 80°C durante 30min, se estandarizaron los grados Brix a 10°, se adicionó el saborizante a una concentración de 0.2%. Se envasó y conservó en las mismas condiciones de esterilidad que la bebida fermentada probiótica.

3.4. Fase III. Intervención de los estudiantes con la bebida fermentada probiótica y la bebida placebo

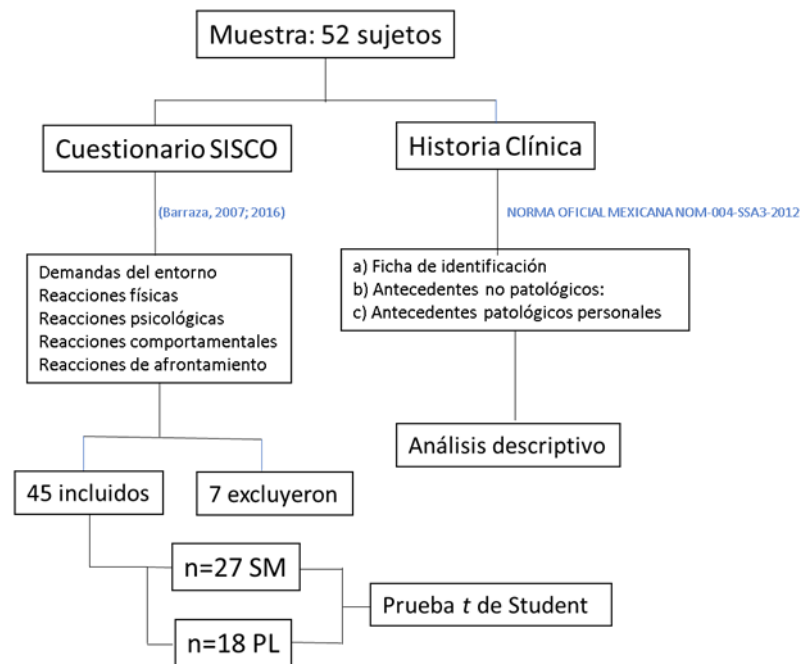


Figura 3-4 Diagrama de flujo del proceso de intervención de los estudiantes.

La administración de las bebidas fue de la forma siguiente: El grupo experimental, EXP (n=27) consumió la bebida de aguamiel fermentada probiótica. Mientras que el grupo control CTL (n=18) consumió la bebida placebo. Las bebidas fueron entregada a los estudiantes para el consumo de 100 ml diarios. Los sujetos no tenían conocimiento que bebida recibían. La administración tuvo una duración de dos meses, 10 de abril- 10 de junio 2019. Se monitorio la administración de las bebidas mediante mensajes de recordatorio y verificación de su consumo.

3.5. Fase IV. Análisis de la medición de estrés académico

3.5.1 Método estadístico

Se calcularon medidas de tendencia central y dispersión para variables numéricas y se calcularon conteos y porcentajes para variables categóricas. Se realizaron las pruebas T de Student y χ^2 de independencia. Los resultados de las pruebas se procesaron utilizando el programa SPSS, versión 23y se consideraron con significancia de $p < 0.05$.

3.5.2. Instrumentos de medición

3.5.2.1. Inventario del estrés académico SISCO.

El instrumento utilizado fue el Inventario SISCO para el estudio de estrés académico. La recolección de datos se realizó aplicando la encuesta en el salón de clases durante el periodo académico de verano. Se elaboró de forma individual, y tuvo una duración de 15 minutos. El Alfa de Cronbach obtenida fue de 0.90. El instrumento consistía en 1 ítem filtro dicotómico que decide si el encuestado seguirá con la encuesta. Un ítem que, en un escalamiento tipo Likert de cinco valores numérico (del 1 al 5 donde uno es poco y 5 mucho), permite identificar el nivel de intensidad de estrés académico. Luego 29 ítems que se responden mediante un escalamiento tipo Likert de cinco valores (Nunca, Casi Nunca, Algunas Veces, Casi Siempre y Siempre). Estos ítems se encuentran divididos en tres secciones: Estresores (8 ítems), Síntomas (15 ítems) y Estrategias de afrontamiento (6 ítems) (Barraza, 2007). Se analizó estadísticamente por χ^2 , de independencia.

3.5.2.2. Historia clínica: Se redactó una historia clínica (Anexo) por cada estudiante que aceptó ser participante voluntario en la investigación, en colaboración con el investigador, antes de la intervención. El documento fue elaborado de acuerdo a las indicaciones estipuladas en la NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-004-SSA3-2012, DEL EXPEDIENTE CLÍNICO y consta de los siguientes apartados:

- a) Ficha de identificación
- b) Antecedentes no patológicos:
- c) Antecedentes patológicos personales
- d) Antecedentes psiquiátricos
- e) Tipo y nivel de actividad física

Para los fines de este estudio solo se reporta la sección de los síntomas del mes, que son: diarrea, flatulencias, distensión, náuseas, estreñimiento, vómito, alteraciones del apetito, pirosis, mareos, hinchazón y borborismo.

3.6. Fase V. Análisis de la Microbiota intestinal

3.6.1. Recolección de las muestras de heces

Se pidieron dos muestras de heces y se recolectaron en dos momentos: La primera muestra de heces se pidió una semana después de aplicar la encuesta a todos los participantes. La segunda muestra de heces se pidió terminado la intervención con las dos bebidas. Se utilizó vaso para toma de muestra estéril modelo H1015S (Vela Quin S de R.L de C.V). Las muestras se congelaron a -70° C inmediatamente después de su recolección y no se sacaron hasta su análisis.

3.6.2. Extracción de ADN bacteriano de las heces

La extracción del ADN microbiano de las muestras de heces se realizó por triplicado, se llevó a cabo mediante el kit QuickDNA Fecal/Soil MiniPrep (Zymo Research, Estados Unidos) según las instrucciones del fabricante. La cuantificación de los ácidos nucleicos se realizó por medio de espectrofotometría UV-visible, midiendo la absorbancia a 260 y 280 nm en un espectrofotómetro (Genova NanoDrop Jenway TM). Los pasos del protocolo son los siguientes:

1. Agregar <150 mg de muestra de heces a un tubo de lisis ZR BashingBeadTM. Agregar 750 µl de buffer BashingBeadTM al tubo. Colocar en un conjunto de soporte de tubos de 2 ml sobre un vórtex y procesar a máxima velocidad por >5 minutos.
2. Centrifugar el tubo de lisis ZR BashingBeadTM en una microcentrífuga a >10,000 x g durante 1 minuto.
3. Transferir hasta 400µl del sobrenadante a un tubo colector con filtro Zymo-SpinTM III-F y centrifugar a 8,000 x g durante 1 minuto.
4. Añadir 1,200µl de buffer Genomic Lysis al filtrado en el tubo colector del paso 3.
5. Transferir 800µl de la mezcla del paso 5 a la columna Zymo-SpinTM IIC en un tubo colector y centrifugar a 10,000 x g durante 1 minuto.
6. Desechar el líquido restante del tubo colector y repetir el paso 5.

7. Agregar 200µl de buffer DNA Pre-Wash a la columna Zymo-Spin™ IIC en un nuevo tubo colector y centrifugar a 10,000 x g durante 1 minuto.
8. Agregar 500µl de buffer g-DNA Wash a la columna Zymo-Spin™ IIC y centrifugar a 10,000 x g durante 1 minuto.
9. Transferir la columna Zymo-Spin™ IIC a un tubo limpio para microcentrífuga de 1.5ml y agregar 100µl (50µl mínimo) de buffer DNA Elution directamente en la matriz de la columna. Centrifugar a 10,000 x g durante 30 segundos para eluir el ADN.
10. Colocar el filtro Zymo-Spin™ III-HRC en un tubo colector nuevo y agregar 600µl de Prep Solution. Centrifugar a 8,000 x g durante 3 minutos.
11. Transferir el ADN eluido al filtro Zymo-Spin™ III-HRC previamente preparado, colocarlo sobre un tubo eppendorf de 1.5ml y centrifugar a 16,000 x g durante 3 minutos.

El ADN se verifica en gel de agarosa al 1%. Se carga 5µl de las muestras mezcladas previamente con 1µl de tampón de carga 6X (Takara). El peso molecular de 1Kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific Inc.). Se utilizó una cubeta Wide-Mini Sub Cell Gt (BioRad, Estados Unidos), fuente de corriente Power Pac 300 (BioRad) a 110V por 60 minutos. Se reveló con bromuro de etidio, durante 10 minutos y lavados con agua destilada durante 10 minutos. El ADN se hace evidente en transiluminador con luz UV.

3.6.3 Concentración y pureza del ADN

La concentración y pureza del ADN se determinó por espectrofotométrica a 260 y 280 nm. Se cuantificó a una absorbancia 260 – 280nm en un espectrofotómetro (Genova NanoDrop Jenway™). Las unidades son en ng/µl a partir de un volumen de muestra de 0.5µL.

Los pasos a seguir son:

1. Limpiar la superficie del sistema de retención de muestra del microespectrofotómetro con 2 µl de agua desionizada libre de RNAsa en la superficie óptica inferior. Luego pasar un paño especial “Kimwipe”.
2. Abrir el software de NanoDrop y seleccionar el módulo de ácidos nucleicos.

3. Calibrar el espectrofotómetro realizando las siguientes acciones: añadir 2 µl de agua desionizada libre de RNasa en el NanoDrop. Limpiar con Kimwipe. Realizar una medida de blanco con 2 µl de agua desionizada RNasa free, limpiar con Kimwipe.

4. Medir la muestra de ADN añadiendo 2 µl.

La concentración de ADN entre 20 – 100ng/µl es deseable para la prueba de PCR en tiempo real

3.6.4. Cuantificación de la phyla *Bacteroidetes*, *Firmicutes* y *Gammaproteobacteria* por qPCR en tiempo real

Los primers usados en este estudio se muestran en la tabla 1.

Tabla 3-3. Primers para la detección de filos

Filo	Nombre del primer	Secuencia	Fuente
<i>Firmicutes</i>	Firm934F	GGAGYATGTGGTTTAATTCGAAGCA	(Guo X <i>et al.</i> , 2008)
	Firm1060R	AGCTGACGACAACCATGCAC	
<i>Bacteroidetes</i>	Bac960F	GTTTAATTCGATGATACGCGAG	(Yang Y-W <i>et al.</i> , 2015)
	Bac1100R	TTAASCCGACACCTCACGG	
<i>Gammaproteobacterias</i>	γ1080F	TCGTCAGCTCGTGTGTGA	(Bacchetti De Gregoris <i>et al.</i> , 2011)
	γ1202R	CGTAAGGGCCATGATG	

La cuantificación de los filos *Firmicutes*, *Bacteroidetes* y *Gammaproteobacterias* se hizo por amplificación del gen16 S ARNr por PCR en tiempo real en un termociclador Rotor-Gene Q usando el kit Rotor-Gene SYBR Green PCR (Qiagen, Estados Unidos).

Las reacciones de PCR se hicieron por triplicado, en un volumen total de 25 µL donde se añadió 1 ng de ADN genómico bacteriano. Los volúmenes de reacción fueron: 7.5µl de SYBR Green Master Mix 2X, 1 µl Primer forward (10 µM) y 1ul de primer reverse 10 uM y , 4.5 µl

de agua libre de RNAsas y 1 µl de ADN genómico (1ng/ µl). Se utilizó el Kit SybrGreen®PCR (Qiagen).

El programa PCR usado en el caso del filo *Bacteroidetes* es el siguiente: 1) 95°C por 5 min, 2) 95°C por 15 s, 3) 64°C por 15 s, 4) 72°C por 4 s, 5) repetir etapas 2, 3 y 4 por 45 veces, 6) 4°C 10 min. El programa PCR usado en el caso del filo *Firmicutes* es el siguiente: 1) 95°C por 5 min, 2) 95°C por 15 s, 3) 61°C por 15 s, 4) 72°C por 10 s, 5) repetir etapas 2, 3 y 4 por 45 veces, 6) 4°C 10 min. El programa PCR usado en el caso del filo *Gammaproteobacterias* es el siguiente: 1) 95°C por 5 min, 2) 95°C por 15 s, 3) 60°C por 15 s, 4) 72°C por 10 s, 5) repetir etapas 2, 3 y 4 por 45 veces, 6) 4°C 10 min.

Las curvas de calibración para el cálculo del número de copias del gen 16S RNAr de los filos de interés fueron preparadas usando cantidades conocidas del plasmido pMiniT 2.0 (New England Biolabs) donde se clonó un gen 16S ARNr de un representante de cada filo de interés. Estos genes fueron amplificados usando primers específicos: Bacto0297 y Bacto1245 para *Bacteroidetes* (Rekha, Alam y Jaishree, 2006) BacF y R1378 para *Firmicutes* (Garbeva, van Veen y van Elsas, 2003) y Bacecofw 1428 y Bacecorev para *Gammaproteobacterias* (Weisburg, Barns, Pelletier y Lane, 1991; Toth, Avrova y Hyman, 2001)

3.6.5. Porcentaje de cambio en abundancia de los filos

La determinación del cambio en abundancia de la phyla *Bacteroidetes*, *Firmicutes* y *Gammaproteobacterias* después del tratamiento comparado con antes del tratamiento se calculó utilizando la fórmula siguiente:

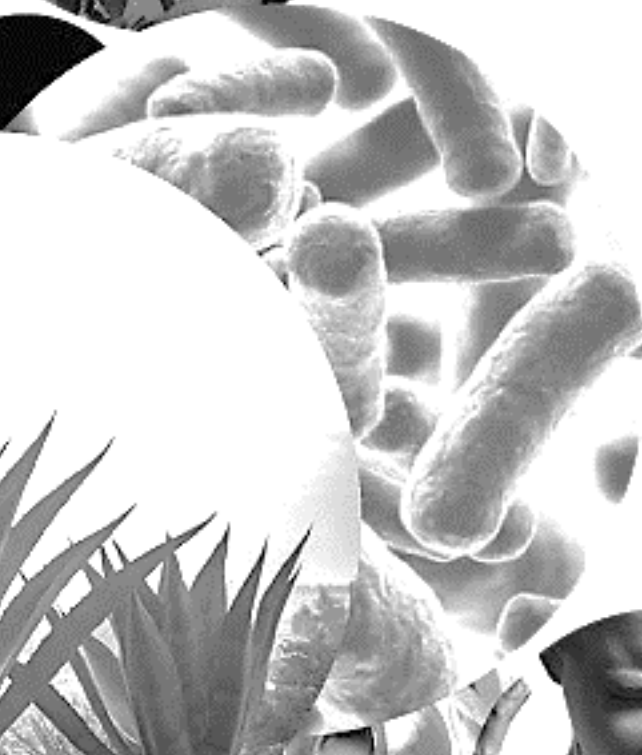
$$\% \text{ cambio en abundancia} = (TD - TA) / TD * 100$$

Total del número de copias después del consumo con el probiótico (TD) menos el total del número de copias antes del consumo del probiótico (TA) por el 100 entre el total del número de copias después del consumo con el probiótico (TD).

3.6.6. Análisis Estadístico de los cambios de abundancia en los filos

Se calcularon las medianas y se determinaron los valores mínimo y máximo del número de copias en cada filo, en cada momento de medición y en cada grupo de intervención. Se

aplicaron las pruebas no paramétricas de Kruskal-Wallis para realizar comparaciones entre los tres filos, la prueba de rangos con signos de Wilcoxon para comparar las mediciones entre antes y después y la prueba de Mann-Whitney para comparar las mediciones entre los grupos de intervención. El análisis se realizó con el programa GraphPad Prism versión 8.0.0 para Windows, GraphPad Software, San Diego, California USA, www.graphpad.com. La significancia estadística se estableció en 0.05.



Capítulo 4

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 FASE I. *Elaboración de la bebida de aguamiel fermentada con probióticos*

4.1.1 *Aislamiento de microorganismos a partir del pulque*

Se obtuvo el crecimiento de 48 hrs del consorcio de bacterias del pulque a partir de un pre-cultivo. Las características morfológicas de las colonias que se observan son diferentes como se observa en la Figuras 4-1).

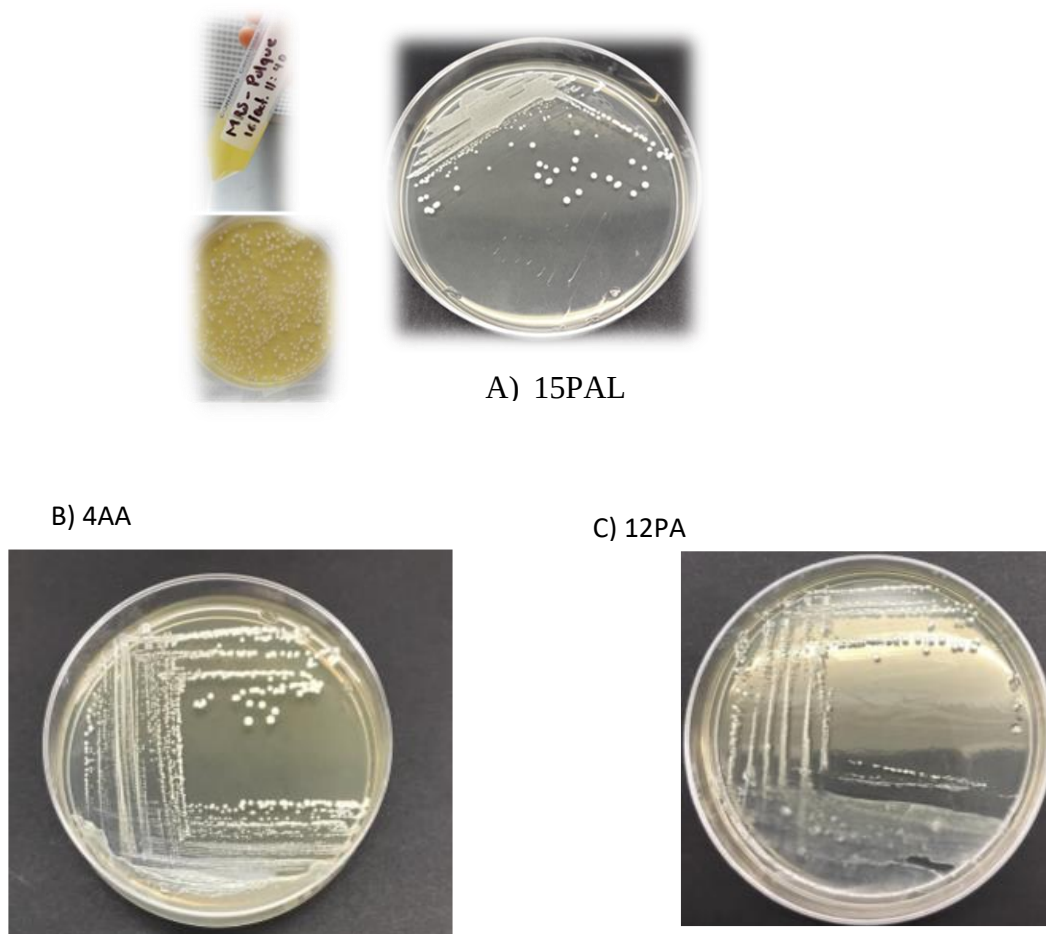


Figura 4-1. Aislamiento de bacterias aisladas de pulque en medio MRS líquido a 37°C.

4.1.2 Selección e identificación de microorganismos

Se seleccionó tres colonias puras, se les nombró 15PAR, 12PAL,4AAL. Las características morfologías macroscópicas de superficie, tamaño, color, borde, densidad, consistencia, luz reflejada y luz transmitida fueron diferentes en cada colonia como se observa en la figura 4-2 en el inóculo realizado en medio MRS sólido de cada cepa seleccionada, en la tabla 4-1 se describen con mayor detalle.

Tabla 4-1. Morfología de las colonias seleccionas vistas macroscópicamente y utilizando en contador de colonias.

Colonia bacteriana Gram-Catalasa	Morfología colonial de superficie	Tamaño	Margen o borde	Color	Superficie	Densidad	Consistencia	Luz reflejada	Luz transmitida
15PAR +/-	Convexa y circular	Grande	Entero	Beige	Lisa	Opaca	Mucoide	Brillante	Opaca
4AAL +/-	Convexa y puntiforme	Mediana	Entero	Blanco	Lisa	Opaca	Seca	Mate	Opaca
12PAL +/-	Convexa y circular	Pequeña	Entero	Beige	Lisa	Opaca	Mucoide	Brillante	Opaca

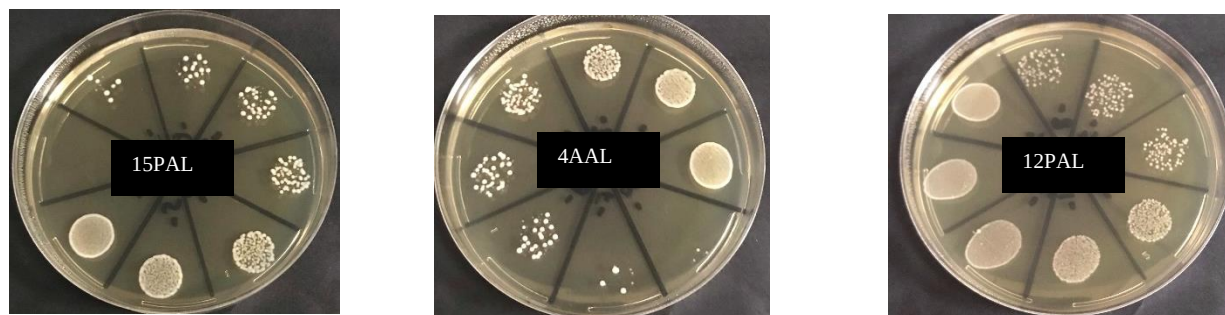


Figura 4-2. Características morfologías macroscópicas de las colonias aisladas de las cepas 15PAL,12PAL y 4AAL.

Para garantizar que los cultivos no tuvieran bacterias patógenas (enterobacterias), se realizó el cultivo en medios diferenciados a partir de cultivos preseleccionados. Se observó nulo crecimiento, por lo tanto, se garantizó la ausencia de bacterias patógenas. En los medios gelosa sangre y gelosa humana se observa el crecimiento de las cepas seleccionadas purificadas.

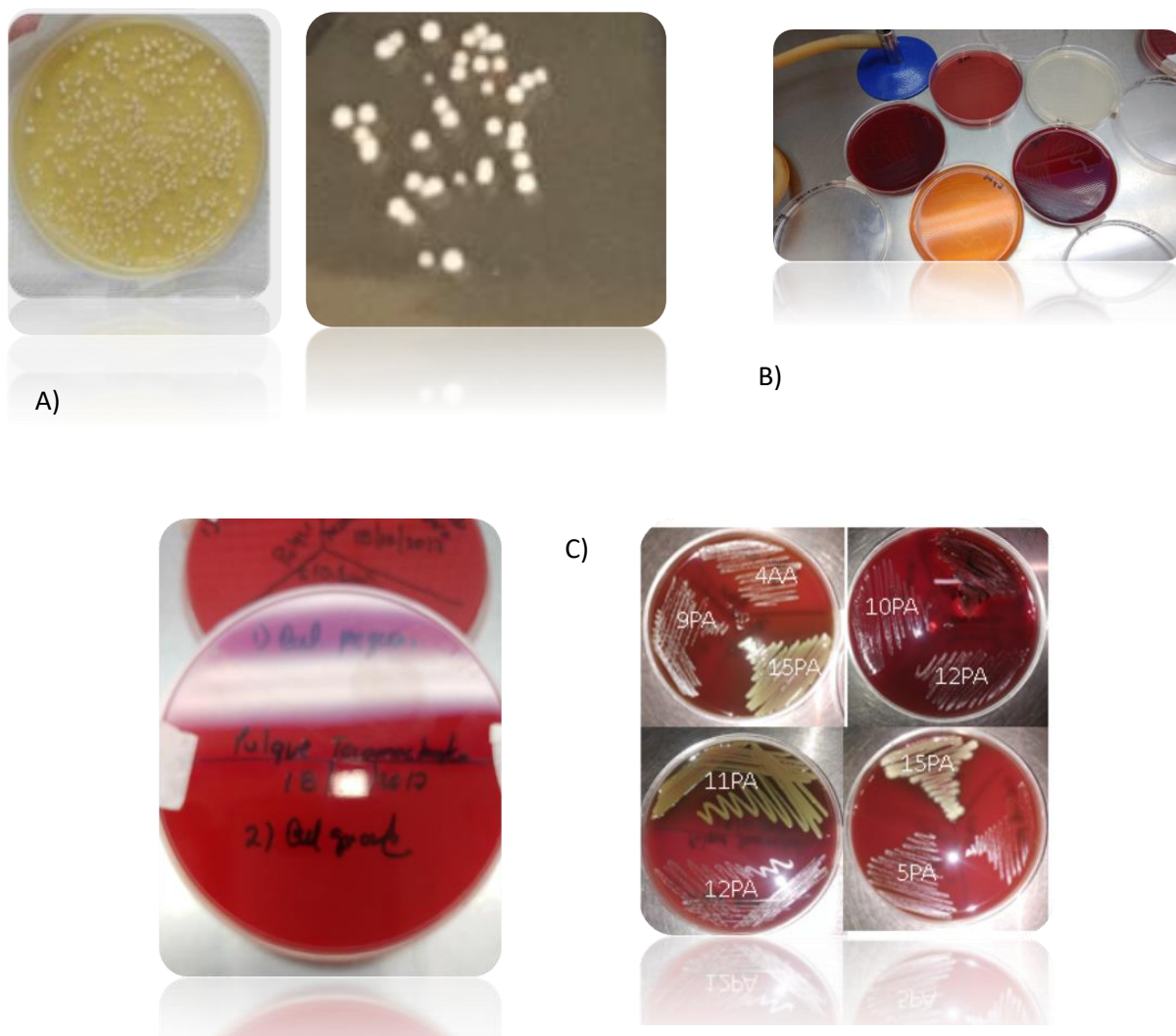


Figura 4-3. Colonias aisladas y purificadas en medios diferenciados. A) Crecimiento de las colonias puras en medio MRS sólido. B) Colonias puras crecidas en medios selectivos C) Crecimiento de las colonias puras en gelosa sangre de carnero y gelosa humana.

Una vez purificadas las cepas, se evidenció que eran bacterias ácido lácticas, la tinción de Gram fue positiva, no hubo desprendimiento de O_2 al adicionar el peróxido de hidrógeno en la prueba de catalasa, por lo tanto es negativa, con disposición individual y en cadenas, inmóviles para las tres cepas seleccionadas (Tabla 4-1). Este resultado coincide con las características del género de *Lactobacillus* que son bacterias ácido lácticas (LAB), muy abundantes en el pulque (Escalante *et al.*, 2016). Son bacterias homofermentativas, anaerobias-aerotolerantes y productoras de ácido láctico (Behera, Ray, y Zdolec, 2018).

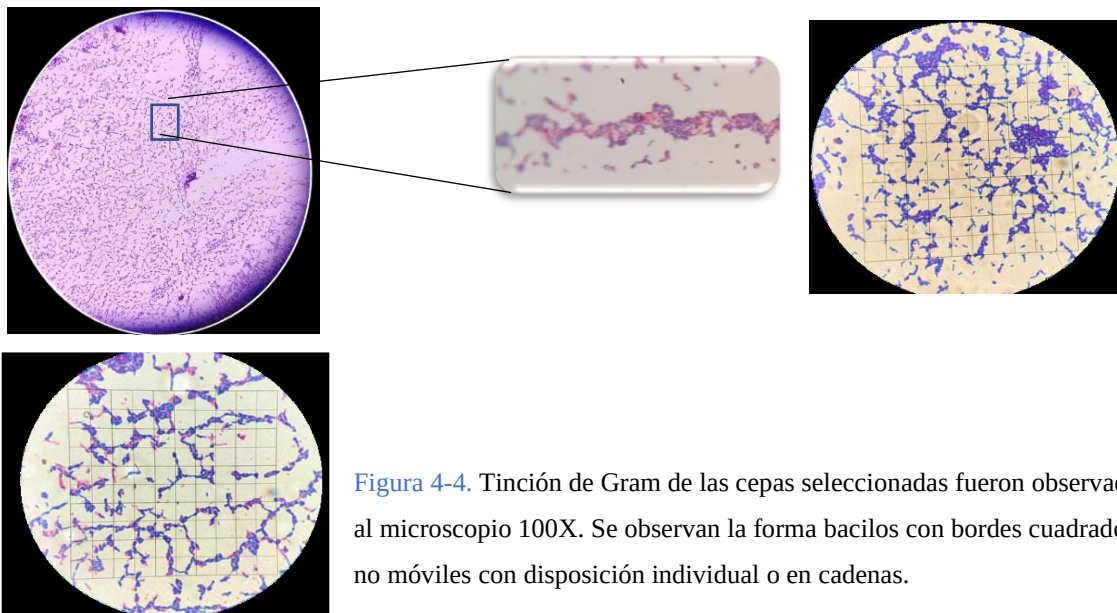
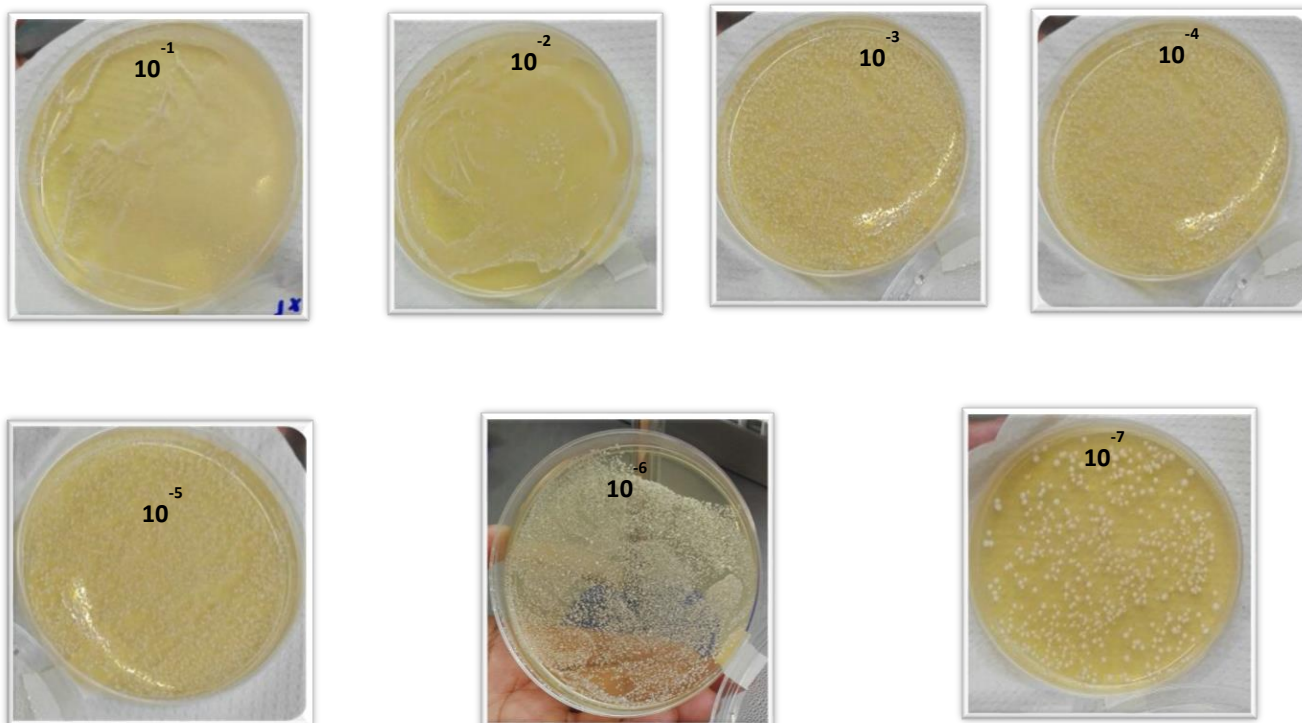


Figura 4-4. Tinción de Gram de las cepas seleccionadas fueron observadas al microscopio 100X. Se observan la forma bacilos con bordes cuadrados, no móviles con disposición individual o en cadenas.

4.1.2.1. Cuantificación de las bacterianas viables

Se encontró que en la dilución 10^{-4} la cepa 12 PAL tuvo 3.15×10^7 UFC/ml, la cepa 15PAL se contó 3.07×10^7 UFC/ml y para para la cepa 4AAL se obtuvo 2.96×10^7 UFC/ml, figura 4-5. Los microorganismos viables fueron obtenidos en diluciones seriadas previamente realizadas en medio MRS sólido



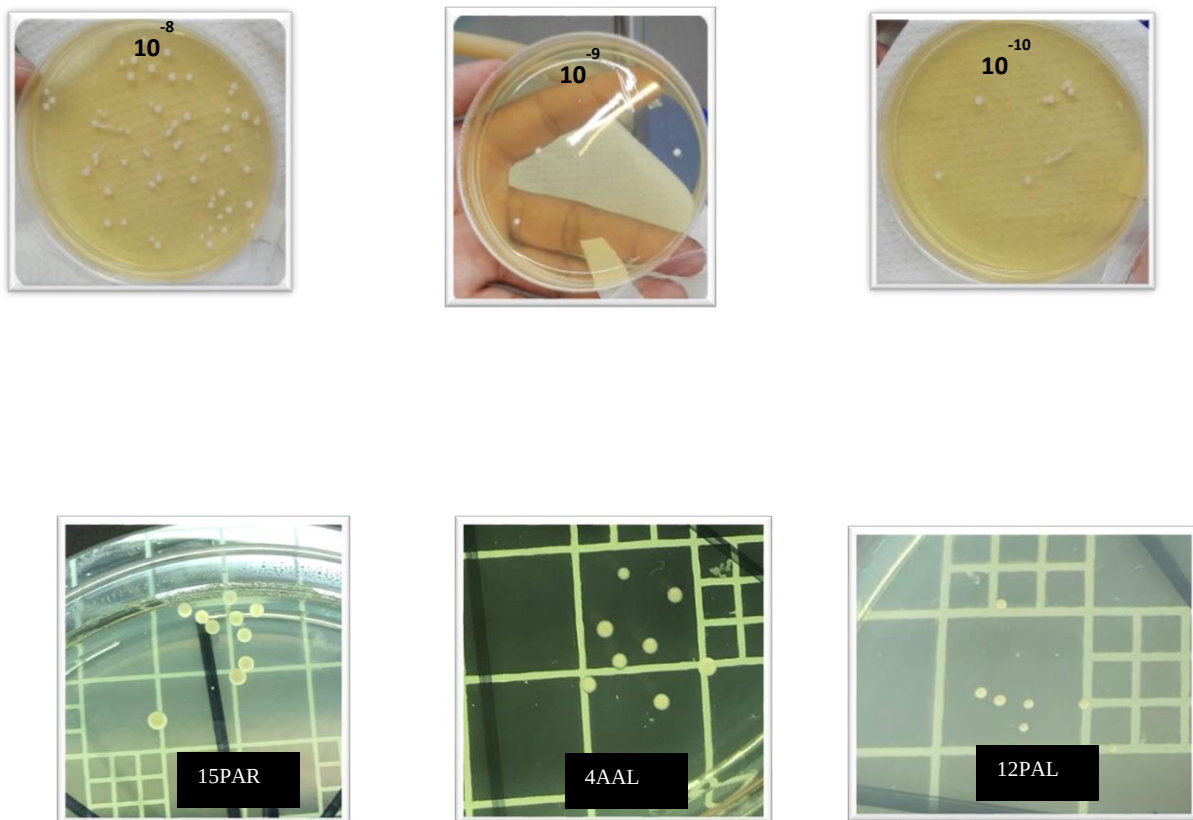


Figura 4-5 Densidad de población bacteriana contada en UFC/ml.

4.1.2.2. Identificación de las cepas seleccionadas mediante espectrometría de masas

Se identificó las bacterias *L. paracasei*, *L. plantarum* y *Lactobacillus brevis* por el método de espectrometría de masas MALDI-TOF, donde los valores de puntaje en oscilan entre 0 a 3. Los resultados encontrados para las 12PAL, 15PAL y 4AAL fueron como se muestra en la siguiente tabla 4-2. Para la cepa 15PAL se obtuvo una identificación altamente probable del género *Lactobacillus* y la especie *paracasei*, para 12PAL se obtuvo la identificación segura del género *Lactobacillus* e identificación probable de especies *brevis*. Para 4AAL se obtuvo la identificación segura del género *Lactobacillus* e identificación probable de especie *plantarum*, la interpretación de los resultados se puede ver en la Tabla 3-1 y 3-1.

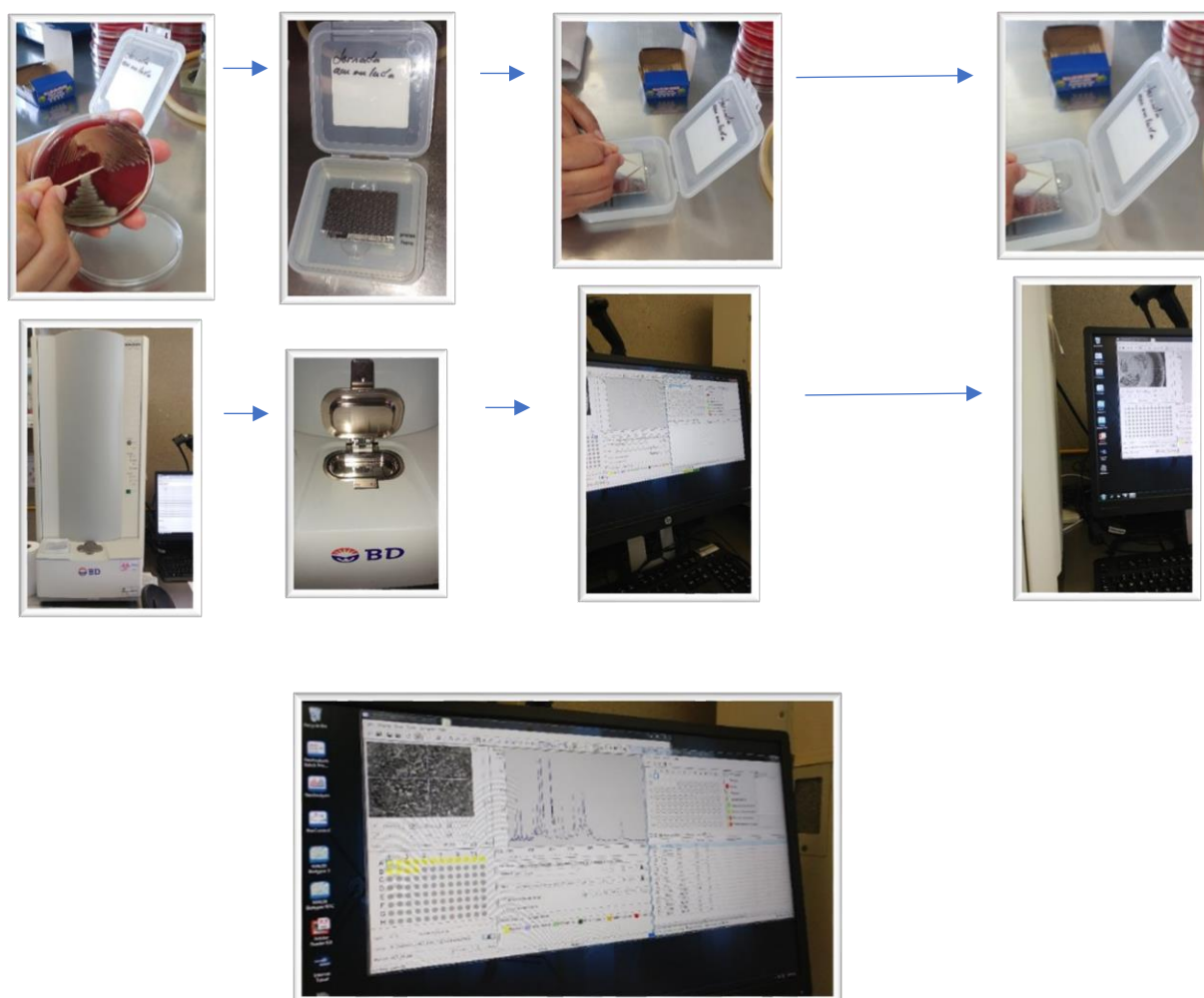


Figura 4-6 Resultado en la identificación de las cepas 15PAL, 4AAL y 12PAL por MALDI-TOF.

Tabla 4-2. Identificación del género y especie identificados mediante el método de espectrometría de masas

Muestra bacteria	Patrón emparejado MALDITOF	Rango de calidad	Valor de puntaje
4AAL	<i>Lactobacillus plantarum</i>	(++) (A)	2.078
12PAL	<i>Lactobacillus brevis</i>	(++) (A)	2.23
15PAL	<i>Lactobacillus paracasei</i>	(++)(A)	2.374
5PAL	<i>Lactobacillus brevis</i>	(++) (A)	2.088
9PAL	<i>Lactobacillus plantarum</i>	(++) (A)	2.135
10PAL	<i>Lactobacillus brevis</i>	(+)(B)	1.9
11PAL	<i>Lactobacillus paracasei</i>	(++) (A)	2.23
20AAL	<i>Lactobacillus paracasei</i>	(++)(A)	2.336
4PAL	<i>Lactobacillus plantarum</i>	(++) (A)	1.87
Control	<i>Escherichia coli</i>	(++) (A)	2.17

Por lo tanto, las cepas aisladas tuvieron una coincidencia al género *Lactobacillus* y la especie vario en su valor de probabilidad. Para esta parte se corrobora la especie con la identificación molecular.

4.1.2.3. Identificación molecular de *L. paracasei*, *L. plantarum* y *Lactobacillus brevis*

La extracción de ADN bacteriano de las tres cepas selecciona se realizó por triplicado, por comodidad se les nombró LB para *Lactobacillus brevis*, LP para *L. plantarum* y LPR para *L. paracasei*. La amplificó del gen 16S ARN ribosomal de las tres bacterias se realizó y los productos amplificados se analizaron en gel de agarosa. Se cuantificó, purificó y la secuencia fue determinada por triplicado usando la técnica de secuenciación *Sanger* en las instalaciones del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (IBT-UNAM).

Las cepas aisladas tuvieron una coincidencia del 99% a *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paracasei* y *Lactobacillus brevis*.

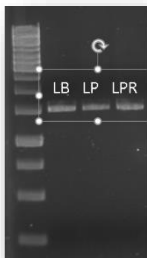


Figura 4-7 Extracción de ADN bacteriano de las cepas LB, LP, LPR.

Sequences producing significant alignments:
Select: All None Selected: 0
Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
☐ Lactobacillus paracasei strain PN3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2006	2006	98%	0.0	98%	KU315074.1
☐ Lactobacillus paracasei strain PN2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2006	2006	98%	0.0	98%	KU315073.1
☐ Lactobacillus paracasei strain PN1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2006	2006	98%	0.0	98%	KU315072.1

Sequences producing significant alignments:
Select: All None Selected: 0
Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
☐ Lactobacillus sp. 47DCCLO2MX 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1134	1134	100%	0.0	99%	FJ538533.1
☐ Lactobacillus plantarum strain AR514 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1129	1129	100%	0.0	99%	MK311266.1
☐ Lactobacillus plantarum strain AR503 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1129	1129	100%	0.0	99%	MK311261.1

Figura 4-8. Alineamientos de las secuencias perteneciente a *L. paracasei* y *L. plantarum*

4. 1.3 Cuantificación del crecimiento bacteriano

Para determinar la cantidad de inóculo que se adicionaría para la preparación de la bebida de aguamiel fermentada con las bacterias probióticas *L. paracasei*, *L. plantarum* y *L. brevis* la cinética de crecimiento de 36 horas puso en evidencia la cantidad de UFC/ml que se adicionarían. En la figura 4-8 se presentan los diferentes comportamientos de crecimiento de tres, se midió la densidad óptica cada 2 horas. *L. brevis* la fase de crecimiento fue lento y su fase exponencial fue menor. El parámetro cinético de *L. paracasei* su tiempo de duplicación fue de 89 min, la velocidad de crecimiento fue de 0.8428 ufc/h y un nivel de ajuste $r^2=0.9535$. En el caso de *L. plantarum* el tiempo de duplicación fue de 69 min, la velocidad de crecimiento fue de 1.0053 y un nivel de ajuste de 0.9003. Finalmente *L. brevis* el tiempo de duplicación alcanzó 112 min, la velocidad de crecimiento fue de, con 0.4565 y el nivel de ajuste 0.9133

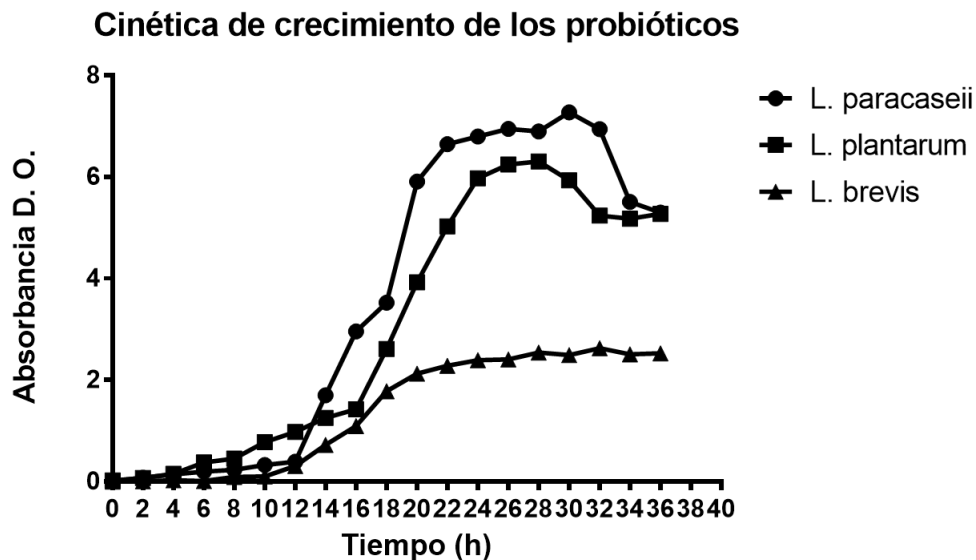


Figura 4-9. Se presentan los diferentes comportamientos de las bacterias *L. paracasei*, *L. plantarum* y *L. brevis* en una cinética de crecimiento de 36 horas medido por densidad óptica cada 2 horas. En donde se observa que *L. brevis* con un menor crecimiento.

4.2 Elaboración de la bebida de probiótica

La bebida de aguamiel alcanzó una concentración de probióticos de 3×10^8 ufc/mL. El envasado se realizó en condiciones de esterilidad usando envases previamente pasteurizados

y su conservación a 4°C. La elaboración tuvo una duración de dos meses, 10 de abril- 10 de junio 2019 (Figura 4-10)

La elaboración de la bebida fermentada de aguamiel preparada elaborada semanalmente para garantizar la viabilidad de los probióticos y conservada en refrigeración a 4°C. la vida de anaquel de la bebida fue de 19 días.



Figura 4-10. Proceso de elaboración de la bebida de aguamiel fermentada con probióticos del pulque. a) Bebida inoculada con los probióticos, b) Incubación, c) Bebida fermentada, d) Envasado en recipientes estériles, e) Sellado hermético para garantizar esterilidad, f) Bebida fermentada probiótica.

4.2.1 Elaboración de la bebida placebo

La bebida placebo fue elaborada a base de agua de coco y saborizante (COCO DREAM®). La elaboración fue en las mismas condiciones de la bebida fermentada probiótica. El sabor agregado de piña coco se eligió basado en una prueba de degustación. Se pasteurizó y estandarizó a 6°Brix (Figura 4-11). El placebo se administrará al grupo control. También se elaboró cada semana para garantizar su inocuidad.

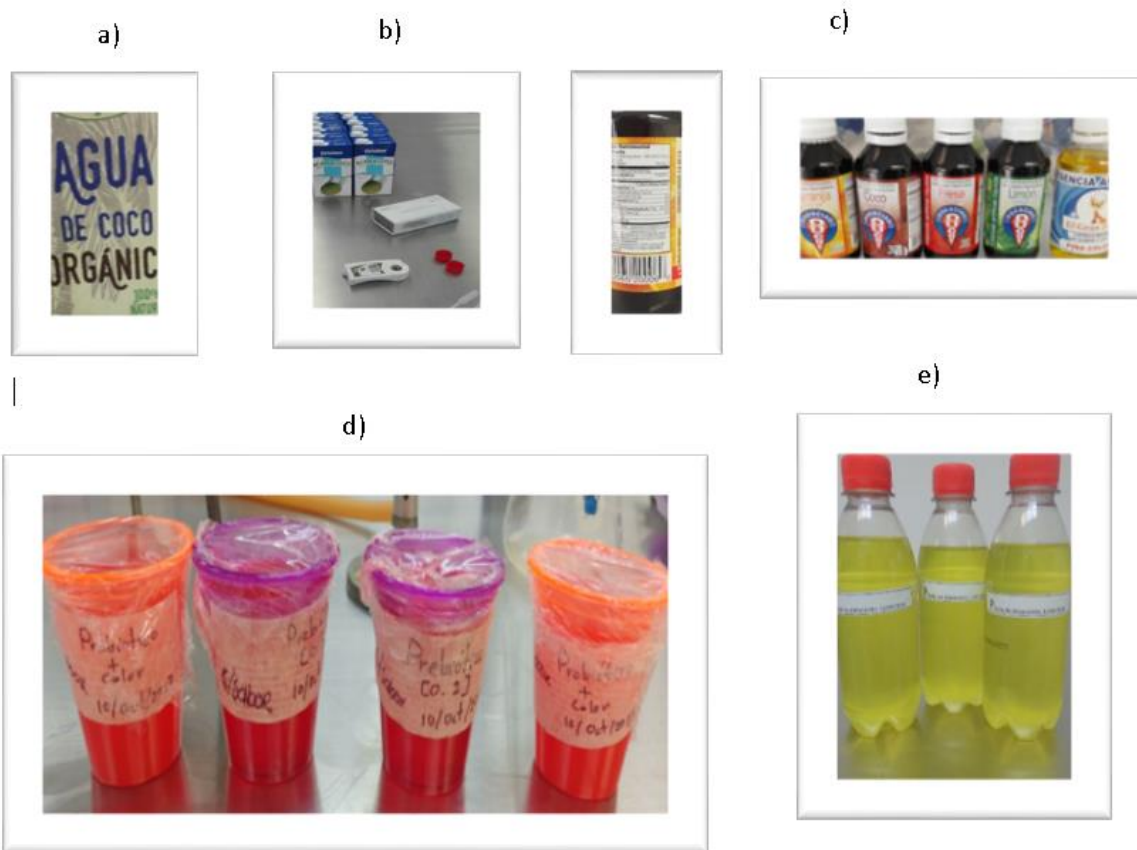


Figura 4-11 a) Bebida de coco utilizada, b) Medición de los °Brix, c) Saborizantes elegido de piña coco d) Prueba de degustación, e) Bebida placebo.

FASE II. Intervención de los estudiantes con la bebida fermentada probiótica y la bebida placebo

La presente investigación tuvo como objetivo evaluar el efecto que tiene la bebida de aguamiel fermentada con probióticos del pulque sobre el estrés académico de estudiantes universitarios de medicina. La bebida fue elaborada a partir de aguamiel como prebiótico y fermentada con

tres bacterias ácido lácticas aisladas del pulque (*Lactobacillus paracasei*, *L. plantarum* y *L. brevis*).

De la muestra de 52 estudiantes, 7 cumplieron con los criterios de eliminación. Por lo tanto, se analizó la información de 45 participantes, de los cuales 60% fueron mujeres y 40% hombres, en el rango de edad de 20 a 25 años. La muestra de 45 estudiantes se dividió en dos grupos para administración de las bebidas: El grupo experimental EXP (n=27) consumió la bebida fermentada de aguamiel y el grupo control CTL (n=18) consumió la bebida placebo. Los estudiantes recibieron un paquete para la semana y consumieron 100 ml diarios durante dos meses de dos meses.

4.3.1 Resultado del análisis descriptivo de los antecedentes patológicos no personales y personales

4.3.1.1 Análisis descriptivo de los antecedentes personales no patológicos

Primero se obtuvieron los resultados del análisis descriptivo de los antecedentes patológicos familiares de la línea materna y paterna de cada estudiante, se incluyó a los padres y a los abuelos maternos y paternos. Los resultados reportados se muestran en porcentaje.

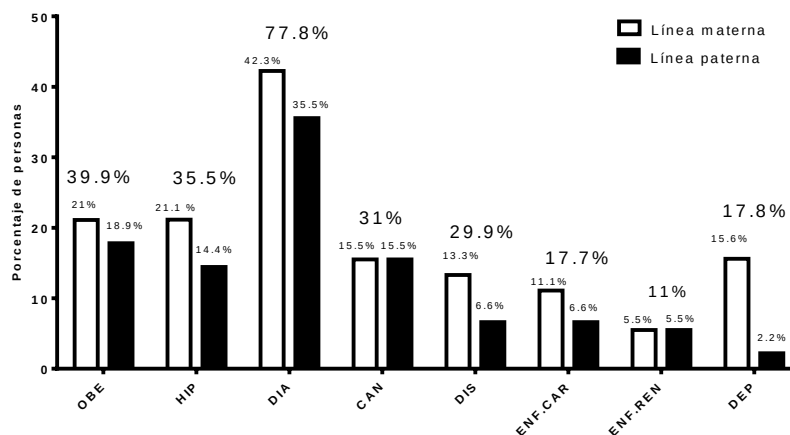


Figura 4-12. Antecedentes patológicos familiares que incluye a los padres y a los abuelos. Se contó las personas en las familias con antecedentes patológicos en la línea materna y la línea paterna. Obesidad (OBE), hipertensión (HIP), diabetes (DIA), cáncer (CAN), dislipidemias (DIS), enfermedades cardíacas (ENF.CAR), enfermedades renales (ENF. REN), depresión (DEP). Se calcularon conteos y porcentajes para variables categóricas.

4.3.1.2. Análisis de los antecedentes personales patológicos

Los resultados del análisis descriptivo de los antecedentes personales no patológicos incluyeron el consumo de alcohol, drogas, tabaco, si viven con animales y el número de horas que duermen. Los antecedentes patológicos incluyeron si tenían cirugías, intolerancia a los alimentos y si padecen alguna alergia.

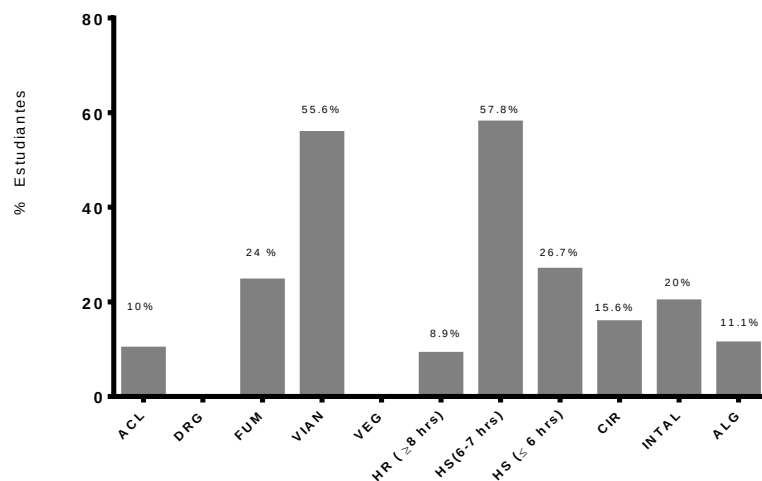


Figura 13. Antecedentes patológicos y no patológico de los estudiantes. Porcentaje de estudiantes que presentaron el antecedente patológico y no patológicos: Consumo de alcohol (ALC), consumo de drogas (DRG), consumo de tabaco (FUM), vive con animales (VIAN), vegetariano (VEG), duerme 8 horas o más (HS ≥ 8 hrs), duerme de 6 a 7 horas (HS 6-7 hrs), duermen menos de 6 horas (HS ≤ 6 hrs), tiene cirugías (CIR), es intolerante algún alimento (INTAL), presenta alergias (ALG).

Se inició el estudio con 45 estudiantes universitarios de medicina que respondieron al instrumento de antecedentes patológicos familiares. Esto incluyó a la madre, el padre y los abuelos maternos y paternos. Los resultados mostraron que la diabetes, obesidad, hipertensión y cáncer, tuvieron una prevalencia significativa en ambas líneas. Las dislipidemias, las enfermedades cardiacas y la depresión fueron de mayor prevalencia en la línea materna. Por lo tanto, en total un 77.8% tienen diabetes y un 39.9% obesidad. Consideramos que son elevados, ya que en años recientes la Organización Mundial de la Salud en el 2016 (OMS) reportó un 8.5% de diabetes y un 70% de obesidad y sobrepeso en el mundo. En el caso de México, reportó solo un 26% de obesidad. Además, los reportes de la Encuesta nacional de salud y nutrición (Ensanut, 2018) en México reportaron un 10.3% de diabetes y un 75.2% de sobrepeso y obesidad. Además, un 19.9% reportó dislipidemias, menor al reporte de Ensanut

(38.7%) en el 2018. Estas enfermedades pueden tener relación con el estrés crónico y el consumo de cantidades excesivas de comida calórica (AlJaber *et al.*, 2019; Silva *et al.*, 2017)

Adicionalmente se encontró que un 35.5% presentó hipertensión y 17.7 % enfermedades cardiovasculares en los familiares, ambos padecimientos están entre las causas principales de muerte en el mundo. Los datos de ENSANUT 2018 reportan que se reportó un 18.4% en México en el 2018 y en el 2019 un 49.2%. Nagaraja *et al.*, han reportado que muchas enfermedades pueden estar relacionadas con el estrés crónico, por estar acompañadas de cambios a nivel molecular, celular, fisiológico o conductual, elevando los niveles de cortisol y adrenalina (Nagaraja, Sadaoui, Dorniak, Lutgendorf y Sood, 2016).

En cuanto al cáncer, un 31% de las familias lo padece. En las últimas investigaciones se ha encontrado que el estrés está vinculado con un desequilibrio del eje hipotalámico pituitario adrenal y efectos simpáticos. Esto puede generar enfermedades crónico degenerativas (Pacholko, Wotton, y Bekar, 2019), que desencadenan metástasis y envejecimiento celular conducentes al cáncer (Kruk, Aboul-Enein, Bernstein y Gronostaj, 2019).

Por otro lado, un 17.8% reportó depresión. Hay evidencias de que este trastorno es resultado de un desequilibrio entre la serotonina y la quinurenina por hiperactividad del sistema inmune y el sistema nervioso en personas enfermas o estresadas (Ramírez *et al.*, 2018). Por otro lado, los problemas renales presentaron un 5.5% en las línea materna y paterna.

Se detectó que aproximadamente la mitad de la población estudiantil encuestada duerme de 6 a 7 horas (57.8%), mientras que una cuarta parte duerme menos de 6 horas (26.7%), y solo una minoría duerme las 8 horas recomendadas (8.9%). Por lo tanto, el 85.5% de estudiantes de medicina con estrés académico tiene un trastorno del sueño. Abdelkader *et al.*, mostró que la mala calidad de sueño afecta el rendimiento académico en estudiantes de medicina (El Hangouche *et al.*, 2018). Por lo tanto, la falta de horas de sueño puede ser un factor que predisponga a enfermedades futuras en los estudiantes universitarios.

La investigación reportó que un 24% de los estudiantes de medicina consumió tabaco y el 10% consumió alcohol. Los reportes de la distribución de consumo de tabaco y alcohol en la población mexicana mayor a 20 años fueron del 11.4% y 21.7% respectivamente (ENSANUT, 2018). El consumo de alcohol y tabaco posiblemente se deba a que los estudiantes

universitarios enfrentan múltiples factores de estrés, como un gran número de trabajos escolares, la presión constante para ser exitosos, la necesidad de cubrir las exigencias sociales o familiares, las preocupaciones cotidianas y asegurar un futuro profesional y económicamente sostenible. Średniawa et al, reportaron el uso de sustancias como medida paliativa por parte de los estudiantes universitarios de Cracovia, Polonia. Además, demostró una correlación de nivel alto de estrés con el consumo de tabaco y las enfermedades crónicas (Średniawa *et al.*, 2019). La Organización Panamericana de la Salud (OPS) en el 2007, estableció que en la mayoría de los países los hombres consumen de 2 a 10 veces más alcohol que las mujeres. La mayoría de las mujeres se abstuvieron de consumir alcohol, mientras que los hombres consumieron de 0-40gr/día (OPS). En este estudio ningún estudiante reportó consumir drogas.

Además, se encontró que más de la mitad de los estudiantes conviven con animales domésticos. La intolerancia a ciertos alimentos fue de 20%. Solo un 11.1% reportó alergias. Esto no es sorprendente, estudios en personas con diferentes alergias presentaron el incremento en los niveles de cortisol, estrés y ansiedad (Glenk et al., 2020), implicado en los cambios de la microbiota intestinal, Esto también se encontró en militares con estrés crónico que manifestaron cambios en la microbiota intestinal y su ciclo circadiano (Karl *et al.*, 2018).

4.3.1.2 Resultados de la sintomatología de los estudiantes antes y después de la intervención con la bebida probiótica.

En cuanto a la sintomatología en los estudiantes, se reportó la presencia o ausencia de once síntomas: diarrea, flatulencias, distensión abdominal, náuseas, estreñimiento, vómitos, alteraciones del apetito, pirosis, mareos, hinchazón y borborismo antes y después de la intervención con la bebida simbiótica y placebo.

Los resultados de las tabulaciones cruzadas mostraron una asociación significativa entre el tratamiento con la bebida simbiótica PAL y la sintomatología. Parece que la intervención con el simbiótico mostró que los síntomas no se hacían presentes en algunos estudiantes.

Respecto al grupo de estudiantes que consumió el placebo no mostró una reducción en casi todos los síntomas a excepción del síntoma de diarrea y pirosis.

Tabla 4-3 Resultados del análisis de tablas cruzadas y prueba χ^2 entre el tratamiento con simbiótico, placebo y la sintomatología que presentaron los sujetos.

Variable	ANTES DEL TRATAMIENTO			DESPUÉS DEL TRATAMIENTO		
	APL	ASM	p	DPL	DSM	p
Diarrea	16	17	.086	15	4	<.001**
Flatulencias	11	22	.175	11	4	.003**
Distensión abdominal	15	16	.111	15	2	<.001***
Náuseas	17	21	.215	17	0	<.001**
Estreñimiento	13	16	.527	13	1	<.001***
Vómitos	18	23	.138	18	1	<.001**
Alteraciones del apetito	14	8	.002**	14	3	<.001***
Pirosis	12	17	1.00	10	0	<.001**
Mareos	15	15	.063	15	0	<.001**
Hinchazón	16	21	.445	16	2	<.001**
Borborismo	12	18	1.00	12	2	.002**

*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, n.s. no significativa. *Prueba χ^2 de independencia entre la presencia de síntomas y el tratamiento en la primera y segunda medición. **APL**: Estudiantes con síntomas antes del tratamiento con placebo. **ASM**: Estudiantes con síntomas antes del tratamiento con el simbiótico. **DPL**: Número de estudiantes con síntomas después del tratamiento con placebo. **DSM**: Número de estudiantes con síntomas después del tratamiento con simbiótico.

4.4. Fase III. Análisis de la medición de estrés académico

Los resultados de la medición de intensidad de estrés académico en los estudiantes después del tratamiento con la bebida fermentada probiótica (grupo EXP) y también muestra la intervención con el placebo (grupo CTL). Se consideró desde N1 y N2 tener poco estrés, hasta N5 mucho estrés Figura 4-10. El grupo EXP percibió 92.8% de estrés alto antes de la intervención y disminuyó a 22.2% después de la intervención. Los resultados de la frecuencia de estudiantes que percibieron niveles de preocupación o nerviosismo antes de la intervención lo podemos ver en la fig. 4-10-b), en el grupo EXP fueron: N5= 22.2%, N4 =55.5%, N3=14.8% N2=3.7% y N1=3. Después de la intervención la frecuencia del nivel de estrés disminuyó. Los estudiantes no reportaron percepción de mucho estrés N5=0 y N4=0, mientras que la mayoría estuvo en una escala de N3= 22.2%, N2=29.6% y N1=48.2%. En el grupo CTL que consumió la bebida placebo, se mantuvo su nivel de estrés alto a 77.7% antes y después del consumo. Los resultados se presentan en la fig. 4-10- a). Los niveles de estrés percibido antes del consumo de la bebida fermentada probiótica fueron: N5=5.5%,

N4=11.1%, N3=61.1%, N2=11.15 y N1=11.15%, mientras que después de la intervención fueron: N5=11.1%, N4=11.1%, N3=55.5%, N2=16.6 y N1=5.5%. Los resultados mostraron que al consumir diariamente 100 mL (3×10^8 ufc/mL) de la bebida fermentada probiótica, durante 8 semanas, redujo la frecuencia del estrés percibido, contrario a los sujetos que recibieron el placebo, estos resultados coinciden con un estudio donde el probiótico elaborado con *Lactobacillus plantarum* DR7 administrado en adultos estresados durante 12 semanas redujo los síntomas de estrés (Chong *et al.*, 2019).

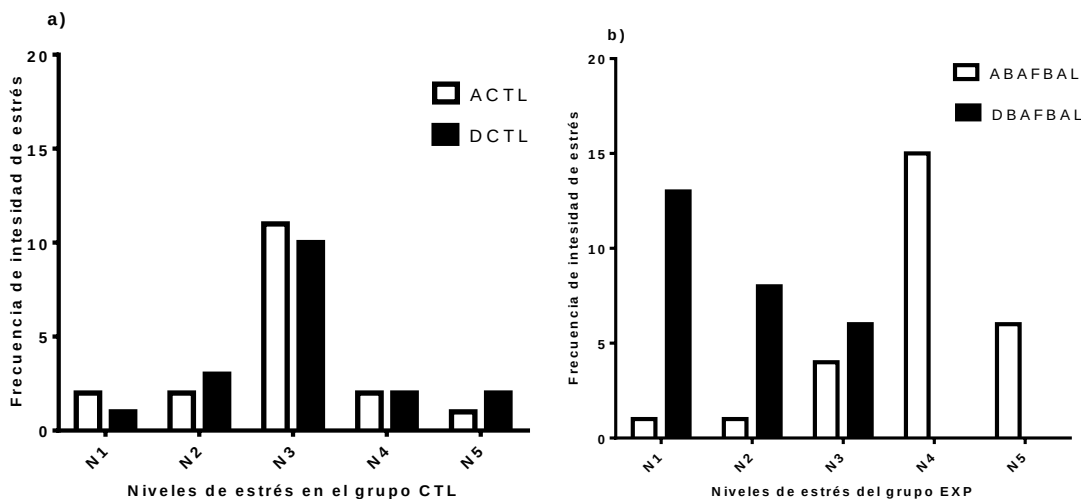


Figura 4-14 Nivel de intensidad de estrés académico. Frecuencia de percepción de estrés: Niveles de estrés: N1, N2 (poco), N3, N4, N5 (mucho). A) Grupo CTL: Antes de la intervención con el control ACTL. Después de la intervención con control DCTL, ($p = .607$). B) Grupo experimental EXP: Antes de la intervención con la bebida hecha de aguamiel fermentada con bacterias ácido lácticas ABAFBAL. Después de la intervención con bebida hecha de aguamiel fermentada con bacterias ácido lácticas DBAFBAL, ($p < .001$). Se realizaron χ^2 de independencia.

Se utilizó la prueba T de Student para datos emparejados para comparar la media de los puntajes de estrés antes y después de tomar el tratamiento. Respecto al grupo que consumió el placebo, solo cuatro aspectos resultaron significativos, presentando medias más bajas en la segunda medición: dos estresores de las demandas del entorno (competencia con los compañeros de grupo [$p = 0.018 < \alpha = 0.05$] y sobrecarga de tareas y trabajos escolares [$p = 0.013 < \alpha = 0.05$]), una reacción física (rascarse, morderse las uñas, frotarse, etc. [$p = 0.014 < \alpha = 0.05$]), y una reacción psicológica (ansiedad, angustia, desesperación [$p = 0.001 < \alpha = 0.01$]). Los resultados para el grupo que consumió la bebida simbiótica indican un cambio significativo en los puntajes de todas las variables, con medias más bajas después del tratamiento. Siete aspectos de las demandas del entorno (competencia con los compañeros de

grupo, sobrecarga de tareas y trabajos escolares, las evaluaciones de los profesores, el tipo de trabajo que te piden los profesores, no entender los temas que se abordan en clase, participación en clase, tiempo limitado para hacer los trabajos [$p=0.001 < \alpha=0.01$]). El aspecto de la personalidad y el carácter del profesor [$p=0.003 < \alpha=0.01$]). En las reacciones físicas (trastornos del sueño, fatiga crónica, problemas de digestión, dolor abdominal y diarrea, rascarse, morderse las uñas, frotarse, somnolencia o mayor necesidad de dormir [$p=0.001 < \alpha=0.01$]). Respecto a dolores de cabeza o migraña [$p=0.002 < \alpha=0.01$]). Se observan valores estadísticamente significativos en las reacciones psicológicas (inquietud, incapacidad de relajarse y estar tranquilo, sentimientos de depresión y tristeza, ansiedad, angustia, desesperación, problemas de concentración [$p=0.001 < \alpha=0.01$]). Mientras que en una reacción psicológica (sentimientos de agresión o aumento de irritabilidad [$p=0.002 < \alpha=0.01$]). Valores significativos en dos reacciones comportamentales (conflictos o tendencias por polemizar o discutir, aumento o reducción del consumo de alimentos [$p=0.001 < \alpha=0.01$]). Una reacción comportamental (aislamiento de los demás [$p=0.019 < \alpha=0.05$] y desgano para realizar las labores escolares [$p=0.006 < \alpha=0.01$]). En las reacciones de afrontamiento cinco presentan valores significativos (habilidad asertiva, elaboración de un plan y ejecución de sus tareas, elogios a sí mismo, búsqueda de información sobre la situación, ventilación y confidencias [$p=0.001 < \alpha=0.01$]). La reacción de afrontamiento de religiosidad con valores [$p=0.002 < \alpha=0.01$]).

Tabla 4-4. Resultados de la comparación antes y después de la intervención para los estresores del entorno (Prueba t), utilizando el cuestionario SISCO.

VARIABLES	PLACEBO			SIMBIÓTICO		
	Antes ($\bar{x}$)	Después ($\bar{x}$)	<i>p</i>	Antes($\bar{x}$)	Después ($\bar{x}$)	<i>p</i>
Estresores de las demandas del entorno						
Competencia con los compañeros de grupo	2.44±.86	1.67±.91	.018*	2.89±.80	1.00±1.11	.001**
Sobrecarga de tareas y trabajos escolares	3.67±.84	2.78±1.35	.013*	4.00±.62	1.41±1.60	.001**
La personalidad y el carácter del profesor	2.28±.83	2.83±1.34	.078n.s.	2.89±.93	1.70±1.79	.003**
Las evaluaciones de los profesores (exámenes, ensayos, trabajos de investigación, etc.)	3.56±1.10	2.89±1.64	.175n.s.	4.11±.70	1.30±1.54	.001**
El tipo de trabajo que te piden los profesores (consulta de temas, fichas de trabajo, ensayos, mapas conceptuales, etc.)	3.06±.87	2.50±1.29	.172n.s.	3.37±.84	1.56±1.80	.001**
No entender los temas que se abordan en clase.	2.89±1.08	2.50±1.10	.321n.s.	3.44±1.01	1.44±1.60	.001**
Participación en clase (responder a preguntas exposiciones, etc.)	2.39±1.33	2.17±1.42	.655n.s.	3.11±1.05	1.30±1.46	.001**
Tiempo limitado para hacer los trabajos	3.00±1.08	2.61±1.46	.401n.s.	3.85±.95	1.37±1.71	.001**
Reacciones físicas						
Trastorno del sueño (insomnio o pesadillas)	2.06±.80	1.61±.98	.119n.s.	2.81±1.11	.85±1.06	.001**
Fatiga crónica (cansancio permanente)	2.00±.97	1.61±1.09	.202n.s.	2.89±1.15	1.19±1.39	.001**
Dolores de cabeza o migrañas	2.11±1.08	1.94±1.16	.681n.s.	3.00±1.24	1.41±1.55	.002**
Problemas de digestión, dolor abdominal y diarrea	1.78±1.06	1.44±.92	.302n.s.	3.19±1.21	.67±.73	.001**
Rascarse, morderse las uñas, frotarse, etc.	2.39±1.24	1.28±.89	.014*	3.52±1.37	.67±.73	.001**
Somnolencia o mayor necesidad de dormir	2.67±.91	2.11±1.18	.096n.s.	3.33±1.00	1.22±1.40	.001**

Reacciones psicológicas						
Inquietud, incapacidad de relajarse y estar tranquilo	2.56±1.20	1.78±1.17	.059n.s.	3.00±.88	.81±.92	.001**
Sentimientos de depresión y tristeza	2.00±.97	1.61±1.09	.218n.s.	2.52±.75	.85±1.06	.001**
Ansiedad, angustia, desesperación	2.11±.90	1.33±.69	.001**	3.26±.94	.96±1.09	.001**
Problemas de concentración	2.67±1.08	2.50±1.47	.712n.s.	3.33±.88	1.33±1.54	.001**
Sentimientos de agresión o aumento de irritabilidad	2.11±1.23	2.17±1.20	.871n.s.	2.56±1.01	1.30±1.46	.002**
Reacciones comportamentales						
Conflictos o tendencias por polemizar o discutir	1.83±.79	1.94±1.16	.717n.s.	2.52±.98	1.26±1.43	.001**
Aislamiento de los demás	1.78±1.17	2.17±1.47	.310n.s.	2.26±1.02	1.33±1.52	.019*
Desgano para realizar las labores escolares	2.11±.90	2.50±1.38	.233n.s.	2.44±.75	1.41±1.50	.006**
Aumento o reducción del consumo de alimentos	2.67±1.19	1.94±1.35	.126n.s.	3.30±.91	1.30±1.35	.001**
Reacciones de afrontamiento						
Habilidad asertiva (defender nuestras preferencias, ideas o sentimientos sin dañar a otros)	3.61±.70	3.17±1.38	.238n.s.	3.85±.72	1.85±1.99	.001**
Elaboración de un plan y ejecución de sus tareas	3.28±.75	2.72±1.36	.135n.s.	3.37±.79	1.59±1.65	.001**
Elogios a sí mismo	3.28±1.07	2.50±1.47	.110n.s.	2.89±1.01	1.11±1.25	.001**
La religiosidad (oraciones o asistencia a misa)	2.22±1.06	2.00±1.33	.631n.s.	2.56±1.19	1.33±1.47	.422ns
Búsqueda de información sobre la situación	2.61±1.09	2.56±1.38	.889n.s.	3.56±.97	1.33±1.57	.001**
Ventilación y confidencias (verbalización de la situación que preocupa)	2.61±1.04	2.67±1.19	.893n.s.	3.30±1.20	1.37±1.50	.001**

*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, n.s. no significativa

Los resultados coinciden con otros estudios donde se ha observado que los estudiantes de medicina valoran estos ítems con mayor frecuencia como estresores (de La Rosa-Rojas *et al.*, 2015; Castillo, Saez, Perez, y Castillo 2018; Macías, García, Madero y León, 2019). Los resultados indicaron una asociación significativa entre el consumo de la bebida fermentada probiótica y los aspectos de las demandas del entorno, reacciones físicas, psicológicas, de comportamiento, así como seis reacciones de afrontamiento, mostrando medias más bajas después de la intervención. Respecto a los síntomas físicos, la bebida probiótica de aguamiel posiblemente generó efectos positivos parecidos al probiótico *Lactobacillus casei Shirota*, reportado, como un efecto benéfico en la calidad del sueño después de estados de estrés alto (Takada *et al.*, 2017). Otros estudios con probióticos multiespecie han reducido la fatiga (Culpepper *et al.*, 2016). En el presente estudio la bebida fermentada probiótica mostró tener efecto en el ítem “fatiga crónica”, mientras que en el placebo no mostró cambio. Además, algunas intervenciones con probióticos han mitigado los síntomas de diarrea y molestias abdominales (Kato-Kataoka *et al.*, 2016), en este sentido la intervención mostró un cambio significativo en este ítem, a diferencia del grupo placebo que no mostró cambio antes de la intervención. Por otro lado, la bebida fermentada probiótica de aguamiel probada en este estudio sugiere tener un efecto favorable en las reacciones psicológicas, como lo muestran probióticos con *Lactobacillus plantarum* 299v que reducen los síntomas de depresión (Rudzki *et al.*, 2019), Se necesitan hacer más estudios profundos que respalde los resultados obtenidos en el instrumento.

Con relación a las reacciones de comportamiento, la bebida fermentada probiótica puede tener un efecto en cambiar los hábitos alimenticios al ser significativo el ítem “aumento o reducción de los alimentos”. Se ha mostrado en otro estudio que el consumo del probiótico con *Lactobacillus rhamnosus* tuvo una disminución de los síntomas del estrés y al mismo tiempo reducción del apetito, antojos y una mejora en la autoestima de las mujeres (Sanchez *et al.*, 2014). También se mostró que la cepa de *Lactobacillus helveticus* NS8 generó cambio en los comportamientos sociales y de ansiedad en ratones (Liang *et al.*, 2015). Si el estrés reduce la capacidad de afrontar problemas, se ha comprobado que la administración de probióticos de especie única o multiespecies, pueden reducirlo y coadyuvar a mejorar la capacidad cognitiva, para afrontar situaciones que se presenten en los estudiantes (Papalini *et al.*, 2019), esto sugiere que la ingesta de la bebida fermentada probiótica de aguamiel tenga efectos parecidos, como se observa en la mayoría de los ítems. Sin embargo, se requiere hacer más estudios con otros instrumentos que lo apoyen.

Respecto al grupo que consumió el placebo 25 de 29 estresores resultaron no significativos y solo cuatro aspectos fueron significativos, presentando medias más bajas en la segunda medición: dos estresores de las demandas del entorno (competencia con los compañeros de grupo $p=0.018$ y sobrecarga de tareas y trabajos escolares $p=0.013$), una reacción física (rascarse, morderse las uñas, frotarse, etc. ($p=0.014 < \alpha=0.05$), y una reacción psicológica (ansiedad, angustia, desesperación ($p=0.001 < \alpha=0.01$). El efecto placebo siempre es importante considerarlo y se conoce de la respuesta en las personas, en algunas ocasiones si funciona como un factor para disminuir el estrés, podría ser una limitante en el estudio (Giri, Sukumaran, Sen y Park, 2018). El estudio mostró que la ingesta de la bebida fermentada probiótica, elaborada de alimentos no lácticos, contribuyeron a una mejor condición frente al estrés, mostrando ser una alternativa que pueda coadyuvar a mitigar los efectos de éste. Es posible, además, que pueda mejorar la vida académica del estudiante, induciendo un efecto favorable en las capacidades cognitivas como la memoria y el aprendizaje que fueron mermadas por el estrés, como lo sugieren investigaciones previas con la ingesta de probióticos (Rudzki *et al.*, 2019).

4.5. FASE IV. Análisis de la Microbiota intestinal

4.5.1 Entrega de muestras y extracción de ADN bacteriano a partir de heces

Los 45 estudiantes se les pidió dos muestras de heces que tomaron en dos momentos, antes del tratamiento y después de terminarlo. Fueron recolectadas por ellos y entregadas en el laboratorio de biotecnología (UPAEP). Se almacenaron inmediatamente a -70°C . Posteriormente se procedió a la extracción de ADN bacteriano. En la figura 4-15 se muestra el gel de agarosa que pone en evidencia el ADN bacteriano (Figura 4-14)

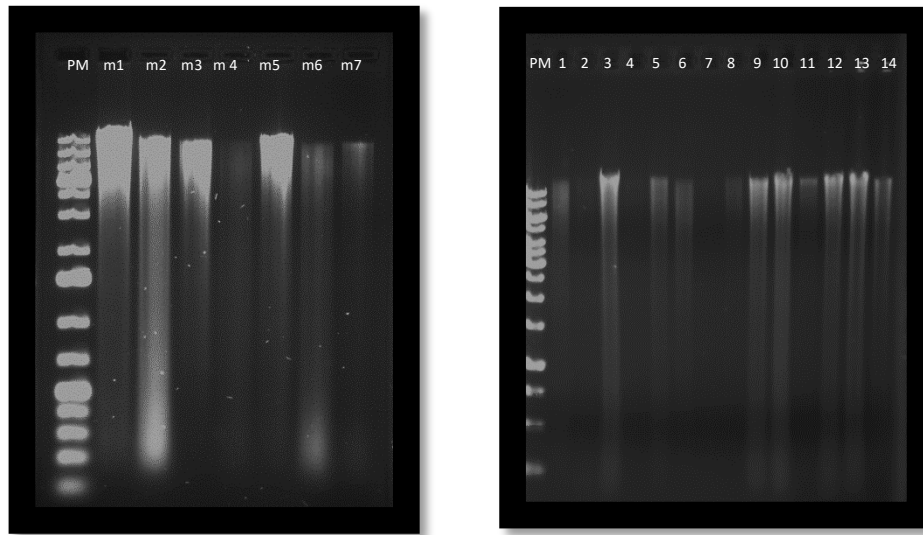


Figura 4 15. Extracciones de ADN bacteriano de muestras de heces

4.5.2 Determinación de pureza y concentración de ácidos nucleicos

Se realizó la medición de la concentración de ADN bacteriano para añadir la cantidad correcta a la reacción de qPCR en tiempo real. La determinación fue realizada en los laboratorios Ruíz de la ciudad de Puebla, México.

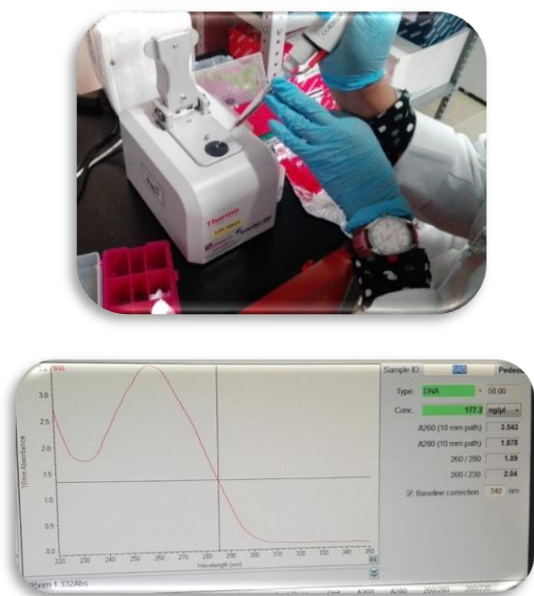


Figura 4-16. Determinación de la concentración (ng/μl) de ADN bacteriano.

4.5.3. Análisis de PCR en tiempo real

4.5.3.1. Curva de calibración

Las curvas de calibración para el cálculo del número de copias del gen 16S RNAr de los filos *Firmicutes* (*Lactobacillus leishmanii*), *Bacteroidetes* (*Bacteroides*) y *Gammaproteobacterias* (*E.coli*) fueron preparadas usando cantidades conocidas del plasmido pMiniT 2.0 donde se clonó un gen 16S ARNr de un representante de cada filo de interés. Se realizaron diluciones crecientes de ADN, Estos genes fueron amplificados usando primers específicos. Se extrapolaron los valores de cada reacción para conocer el CT. Las figuras 4-17 muestra las curvas estándar junto con las ecuaciones para determinar el número de copias, tomadas de Alvarado, (2017) y Elorduy (2019)

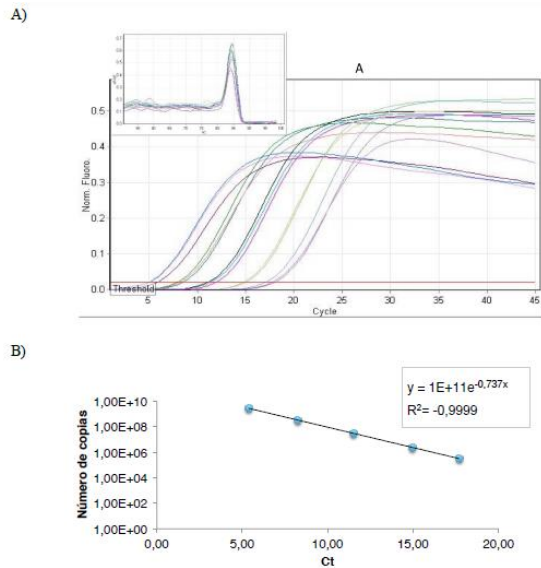


Figura 4.1 Diluciones seriadas a partir del DNA plasmídico pMiniT/gen 16S RNA de *Firmicutes*. A) Curva de amplificación con curva de disociación B) Curva de calibración.

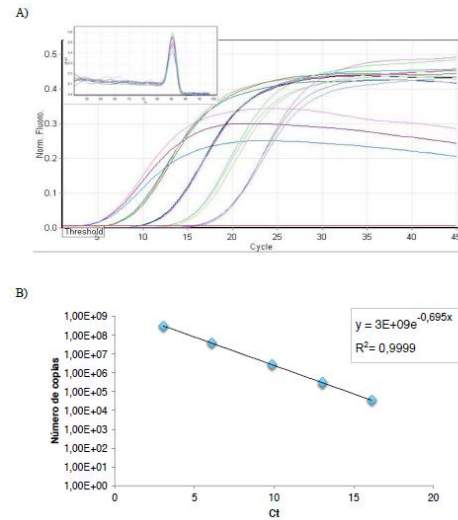


Figura 4.2 Diluciones seriadas a partir del DNA plasmídico pMiniT/gen 16S RNA de *Bacteroidetes*. A) Curva de amplificación y disociación con curva de calibración.

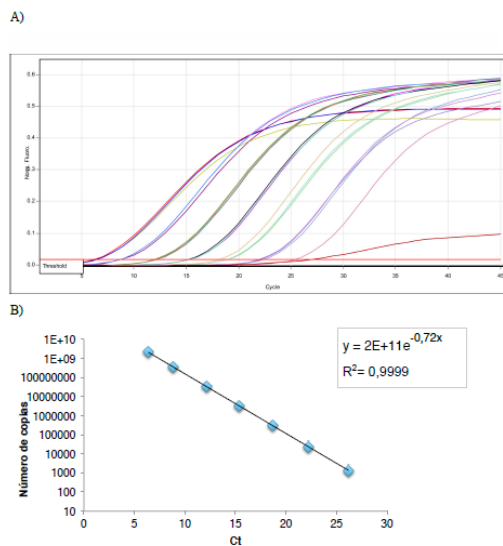


Figura 4.4 Diluciones seriadas a partir del DNA plasmídico pUC19/gen 16S RNA de *Gammaproteobacteria*. A) Curva de amplificación y disociación B) curva de calibración.

Figura 4-17. Curvas de calibración estandar para el cálculo del número de copias del gen 16S RNAr de los filos *Firmicutes*, *Bacteroidetes* y *Gammaproteobacterias*. Fotografía tomada de tesis Alvarado, (2017) y Elorduy (2019).

4.5.3.2 Resultados de qPCR en tiempo real

Las 45 muestras divididas en los dos grupos experimental y control se amplificaron por triplicado para los diferentes filos. Se realizó el qPCR en tiempo real antes y después de la intervención con la bebida de aguamiel fermentada. La figura 4-18 muestra los CT y las curvas de amplificación de algunas muestras. Se obtuvo el número de copias del gen 16S RNA de los tres filos.

A) *Firmicutes*

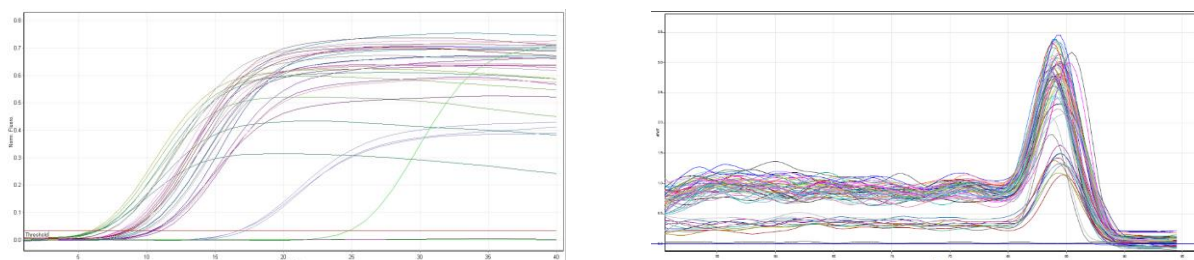


Figura 4-18. Curva de disociación de algunas muestras para el gen 16S RNA de *Firmicutes* y la curva de amplificación con primers específicos BacF y R1378.

B) *Bacteroidetes*

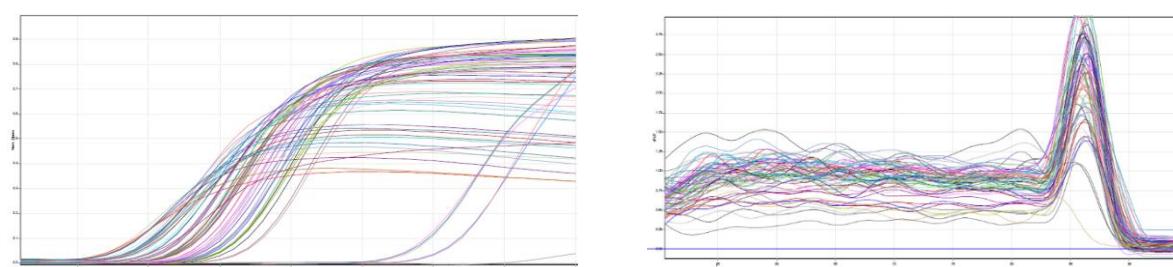


Figura 4-19. Curva de disociación de algunas muestras para el gen 16S RNA de *Bacteroidetes* y la curva de amplificación con primers específicos Bacto0297 y Bacto1245.

C) *Gammaproteobacterias*

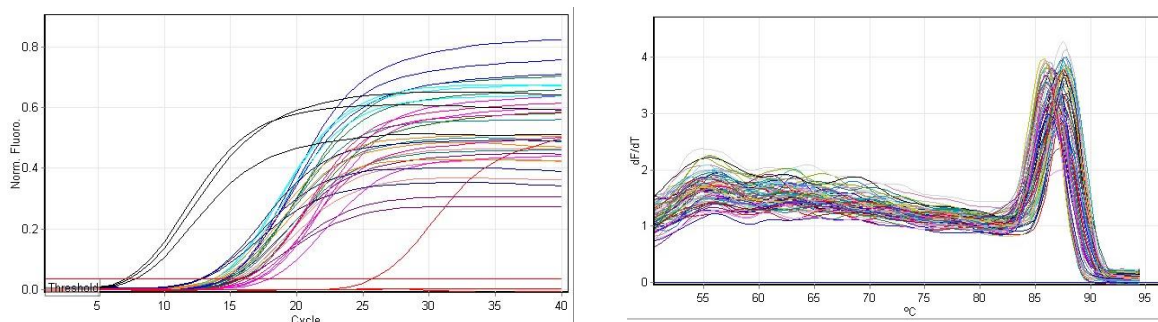


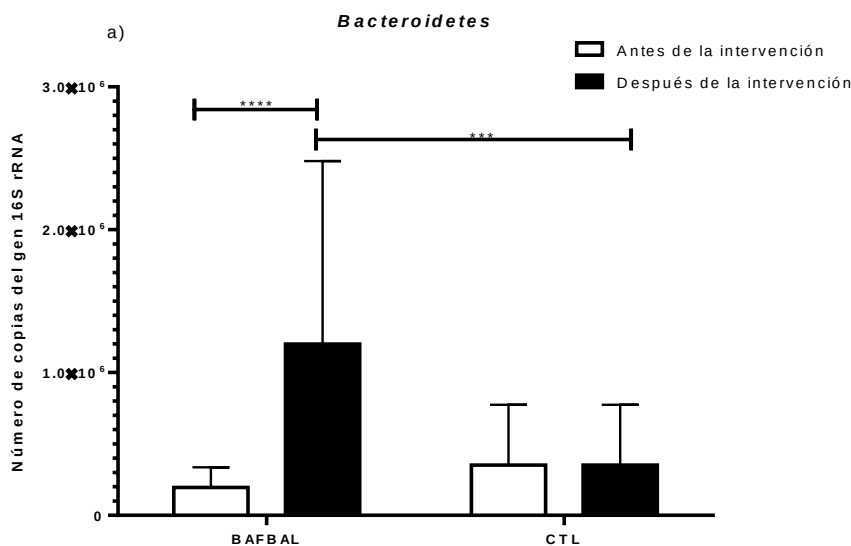
Figura 4-20. Curva de disociación de algunas muestras para el gen 16S RNA de *Gammaproteobacterias* y la curva de amplificación con primers específicos Bacecofw 1428 y Bacecorev

4.5.4 Efecto del consumo de la bebida fermentada probiótica en la microbiota intestinal.

Se evaluó el efecto del consumo de la bebida fermentada probiótica en tres filos de la microbiota intestinal de estudiantes con estrés: *Bacteroidetes*, *Firmicutes* y *Gammaproteobacterias*, mediante la amplificación del gen 16S ARNr por PCR en tiempo

real a partir de extractos de ADN de heces recolectados antes y después del consumo de las bebidas.

Los resultados se presentan en la fig. 4-20, donde se muestra el número de copias del gen 16 S ARNr de los tres filos. El análisis ANOVA en la phyla *Bacteroidetes* mostró un aumento significativo en la mediana del número de copias del gen 16S en heces del grupo EXP después de la intervención ($p < 0.0001$), mientras que en el grupo placebo no se encontraron diferencias significativas en la mediana del número de copias del gen 16S entre el antes y el después de la intervención ($p \geq 0.5798$). En el filo *Firmicutes* mostró un aumento significativo en la mediana del número de copias del gen 16S en heces del grupo EXP después de la intervención ($p < 0.0056$), mientras que en el grupo placebo se encontró una diferencia en la mediana del número de copias del gen 16S entre el antes y el después de la intervención ($p \geq 0.0385$). Respecto al filo *Gammaproteobacterias*, no mostró diferencias significativas en la mediana del número de copias del gen 16S entre el antes y el después de la intervención en ambos grupos, EXP ($p \geq 0.0731$) y placebo ($p \geq 0.2121$).



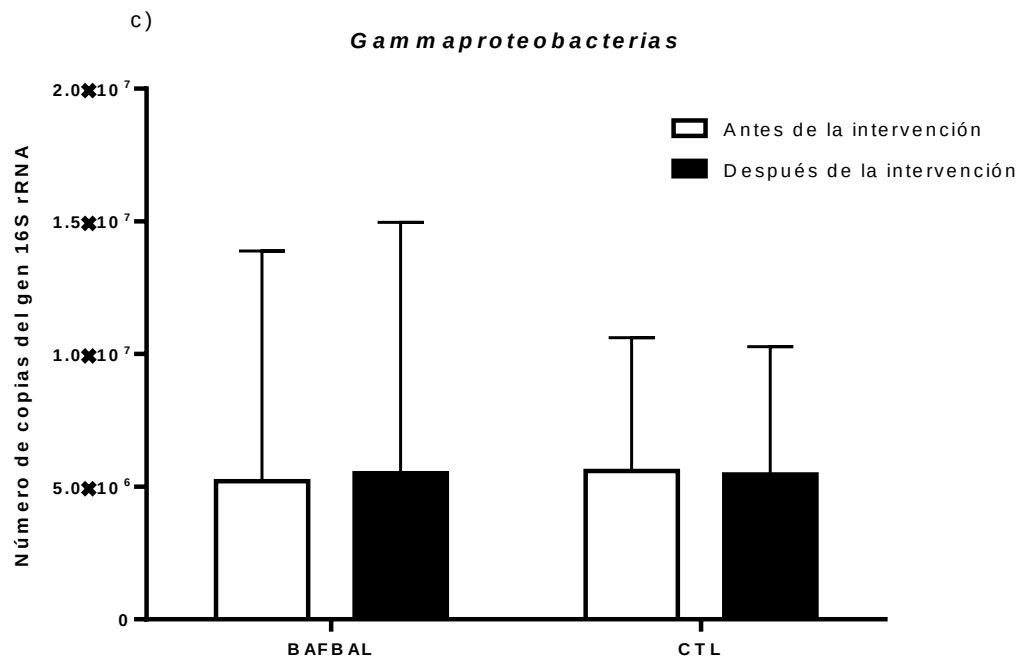
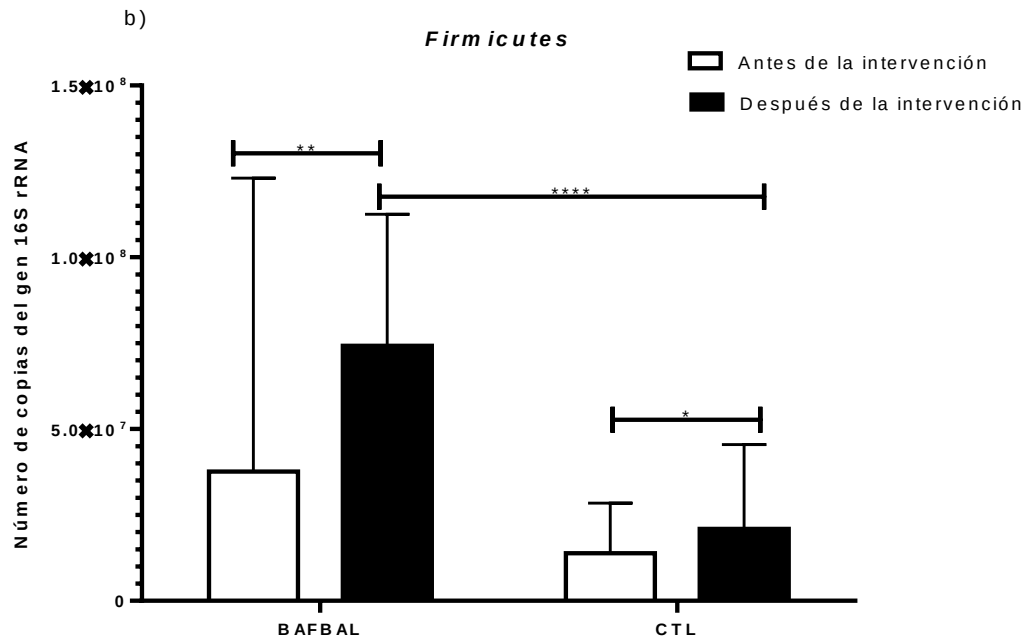


Figura 4-21. Resultados del promedio de la phyla estudiada en los estudiantes con estrés (n=27) expresada en número de copias de ADN antes y después de la intervención con la bebida hecha de aguamiel fermentada con bacterias ácido lácticas BAFBAL y con el control CTL (n=18); a) Filo *Bacteroidetes* b) Filo *Firmicutes*, c) Filo *Gamma proteobacterias*.

Debido a la gran variabilidad natural entre individuos en el número de bacterias de cada filo en la microbiota intestinal, elegimos representar los resultados en porcentaje de cambio en cada individuo entre antes y después del consumo de la bebida probiótica y de la bebida placebo. Los resultados se muestran en la figura 4-21. Se observa un aumento significativo en la abundancia de *Bacteroidetes* después del consumo de la bebida probiótica, mientras no se observa un cambio significativo de la abundancia de este filo después del consumo de la bebida placebo. El consumo de ambas bebidas (probiótica y placebo) resultó en un aumento de la abundancia del filo Firmicutes. Sin embargo, el consumo de la bebida probiótica generó un aumento significativamente más alto de la abundancia de *Firmicutes* que el consumo de la bebida placebo. Cuanto al filo *Gammaproteobacterias*, no se observó un cambio significativo en su abundancia en la microbiota intestinal después del consumo de la bebida probiótica al igual del consumo de la bebida placebo.

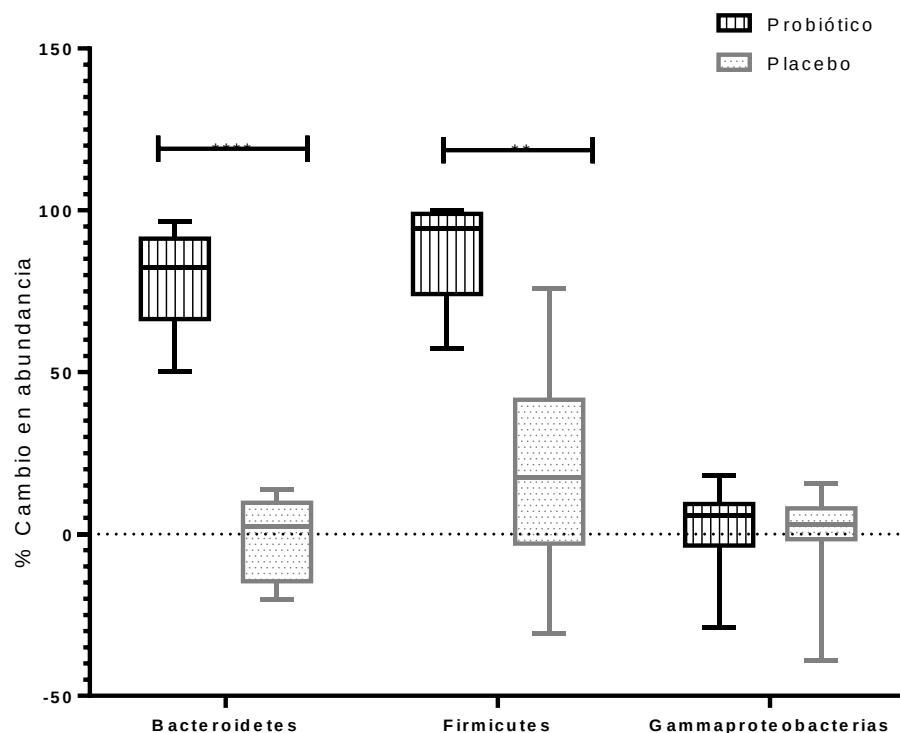


Figura 4-22. Porcentajes de cambio en abundancia en gráfica de caja y bigote. Porcentaje de cambio en abundancia (%) estimada con los promedios de número de copias antes y después de la intervención con la bebida probiótica y placebo. % cambio de abundancia= $(TD - TA) / TD \times 100$.

El aumento de la abundancia de *Firmicutes* en la microbiota intestinal del grupo AGAP, después del periodo de intervención con la bebida probiótica, podría ser una consecuencia del

consumo diario de una bebida fermentada con 3 especies del género *Lactobacillus* que pertenece al filo *Firmicutes*. Estudios anteriores han relacionado el consumo de cepas del género *Lactobacillus* con el aumento de la abundancia del filo *Firmicutes* en la microbiota intestinal (West *et al.*, 2012; Cox, Makino, Cripps y West, 2019). El aumento observado de la abundancia del género *Bacteroidetes* después del consumo de la bebida probiótica está en acuerdo con estudios anteriores donde el consumo de la cepa *Lactobacillus cacei Shirota* permitió la corrección de la disminución de este filo en la microbiota intestinal de personas con obesidad (Stadlbauer *et al.*, 2015; Koliada *et al.*, 2017). La ausencia de efecto del consumo de la bebida probiótica sobre la abundancia del filo *Gammaproteobacterias* fue un resultado algo sorprendente como nuestra hipótesis era observar una baja en su abundancia. Sin embargo, este resultado está en acuerdo con un estudio previo donde no se observa un cambio significativo en la abundancia de Enterobacteriaceae tras el consumo de *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium animalis* (Bogovič Matijašić *et al.*, 2016).

Estos resultados sugieren que el consumo de la bebida probiótica resultó en el restablecimiento de un equilibrio sano en la microbiota intestinal de alumnos con estrés mediante el aumento de la abundancia de *Bacteroidetes* y *Firmicutes* (Figura 4-22). Es probable que este cambio sea el resultado de un aumento de la abundancia de especies benéficas pertenecientes a ambos filos. Sin embargo, estudios más profundizados con una identificación a nivel de género es necesaria para poder hacer esta afirmación. Es importante notar que mientras la abundancia del filo *Gammaproteobacterias* no cambió significativamente después del consumo de la bebida probiótica, su proporción del total de bacterias bajó tras el aumento significativo de *Bacteroidetes* y *Firmicutes*. La disminución del nivel de estrés de los alumnos de medicina tras el consumo de la bebida probiótica parece estar relacionado con el restablecimiento de una microbiota intestinal sana. La disminución del nivel de estrés de los alumnos de medicina tras el consumo de la bebida probiótica parece estar relacionado con el restablecimiento de una microbiota intestinal sana.

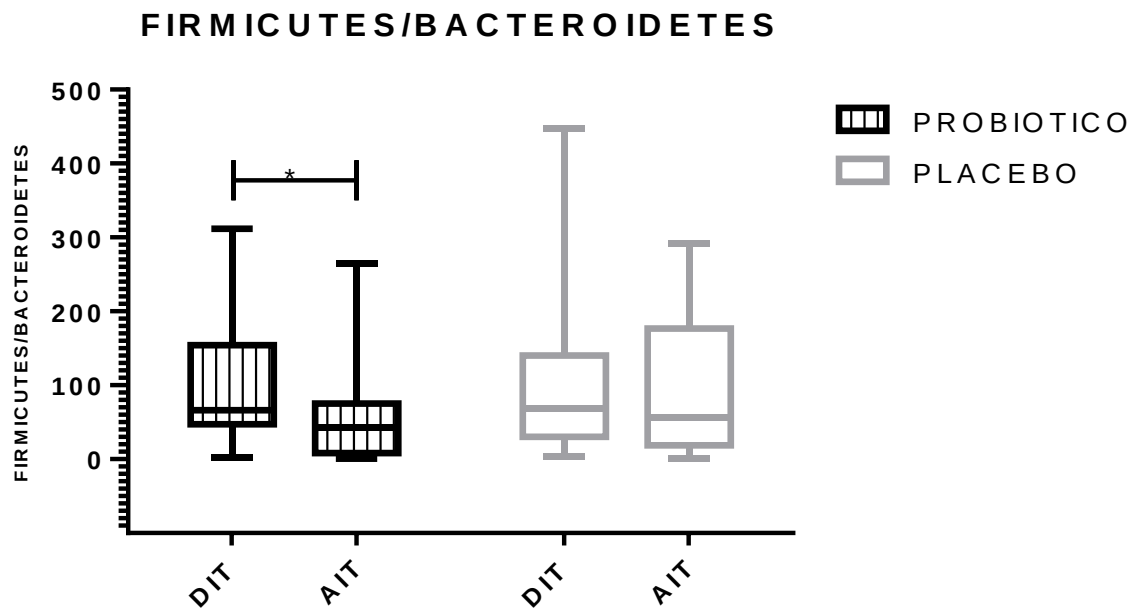


Figura 4-23. Razón Firmicutes/Bacteroidetes



5. Conclusiones

- Los estudiantes de medicina presentan niveles de estrés elevado y la bebida de aguamiel fermentada con *Lactobacillus paracasei*, *L. plantarum* y *L. brevis* lo reduce.
- En la prueba de los estresores, los resultados indicaron una asociación significativa entre el consumo de la bebida simbiótica PAL y los aspectos de las demandas del entorno, reacciones físicas, psicológicas, de comportamiento, así como seis reacciones de afrontamiento, mostrando medias más bajas después del tratamiento
- La bebida simbiótica PAL elaborada con prebiótico de aguamiel y probióticos del pulque -*Lactobacillus paracasei*, *L. plantarum* y *L. brevis*- reducen los niveles de estrés percibido y mitigan la sintomatología gastrointestinal como diarrea, flatulencias, distensión abdominal, náuseas, estreñimiento, vómitos, pirosis, mareos y borborigmo.
- La bebida de aguamiel fermentada con probióticos del pulque puede restablecer el equilibrio sano de la microbiota intestinal aumentando los filos *Firmicutes*, *Bacteroidetes* y reduciendo el filo *Gammaproteobacterias*.
- La bebida fermentada probiótica a base de aguamiel fermentado con *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paracasei* y *Lactobacillus brevis*, tiene un efecto benéfico en la reducción del estrés y restablece un buen equilibrio en la microbiota intestinal de los estudiantes universitarios, sin cambiar su estilo de vida o de dieta.

Artículo científico:

Electronic Journal of Biotechnology

Effects of ingesting a traditional Mexican beverage fermented with lactic acid bacteria on stress in medical students.

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Article Type:	Original Research Article
Keywords:	Aguamiel; academic stress; lactic acid bacteria; dysbiosis; gut microbiota; medical students
Corresponding Author:	Beatriz Pérez-Armendáriz, Ph.D. UPAEP: Universidad Popular Autonoma del Estado de Puebla Puebla, MEXICO
First Author:	Laura Márquez-Morales, Ms C
Order of Authors:	Laura Márquez-Morales, Ms C Elie Girgis El-Kassis Judith Cavazos-Arroyo, Dr. Fidel Martínez-Gutiérrez, Dr. Beatriz Pérez-Armendáriz, Ph.D.
Abstract:	Background Dysbiosis of the gut microbiota has been associated with different illnesses and emotional disorders such as stress. Traditional fermented foods rich in probiotics suggest modulation of dysbiosis, protecting against stress-induced disorders. Results The SISCO Inventory of Academic Stress showed that the consumption of 100 mL of a drink fermented with lactic acid bacteria (3×10^8 cfu/mL) for 8 weeks reduced academic stress to 22.2%. Significant change was shown in the scores for environmental demands and physical, psychological and coping responses. Consumption of the probiotic beverage significantly increased the phyla Firmicutes and Bacteroidetes but not Gammaproteobacteria. No significant changes were found in the placebo group, with the exception of a slight increase in the phylum Firmicutes. Conclusion The aguamiel-based probiotic beverage fermented with <i>Lactobacillus plantarum</i>, <i>Lactobacillus paracasei</i> and <i>Lactobacillus brevis</i>, suggests a reduction of stress-related symptoms and restores balance to the gut microbiota of university students, without changing their lifestyle or diet.

ANEXOS

Anexo 1. Consentimiento bioético

Se cumplieron todos los requisitos que rigen la investigación en seres humanos como la declaración de Helsinki, el reglamento de la ley general de salud en materia de investigación para la salud y la Norma Oficial Mexicana 012-SSA3.



Puebla, Pue., a 25 de mayo de 2018.

Laura Márquez Morales
Investigador Principal

P R E S E N T E

Estimada Mtra. Márquez Morales:

Sirva la presente para notificarle que el Comité de Ética en Investigación del Departamento de Ciencias de la Salud UPAEP (CONBIOETICA21CEI00620131021), ha revisado el Protocolo del Estudio:

"Efecto de los simbióticos en la microflora intestinal en una población de estudiantes mexicanos con estrés que pertenecen a la Universidad Popular Autónoma del Estado de Puebla"

Y después de su revisión emite el siguiente

DICTAMEN

"APROBADO"

Exhortamos a la Mtra. Laura Márquez Morales, investigador principal, a continuar con el buen desempeño en su actividad de investigación basada en las buenas prácticas clínicas. Se extiende la presente a solicitud de la interesada.

ATENTAMENTE
"La Cultura al Servicio del Pueblo"

M. Cs. **Juan Ángel Alonso Arce**
Presidente del Comité de Ética en Investigación
Departamento de Ciencias de la Salud
UPAEP



Ccp. Departamento de Investigación UPAEP.
Ccp. Archivo.

UPAEP
75 Sur 103
Barrio de Santiago
Puebla, Pue. México
C.P. 72400

Tel. 01 (222) 229 9400
Fax: 01 (222) 232 5254
01 800 228 2200
www.upaep.mx

Anexo 2. Consentimiento informado

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN UN ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN:

Título del protocolo: Efecto de una bebida “simbiótica” en la microbiota intestinal en una muestra de estudiantes mexicanos con estrés que pertenecen a la Universidad Popular Autónoma del Estado de Puebla

Investigadores: M.C. Laura Márquez Morales, Dra. Beatriz Pérez Armendáriz, Dra. Judith Cavazos Arroyo, Dr. Elie Girgis El Kassis, Dr. Fidel Martínez Gutiérrez.

Sede donde se realizará el estudio: Universidad Popular Autónoma del Estado de Puebla

Nombre del paciente: _____

A usted se le está invitando a participar en este estudio de investigación médica. Antes de decidir si participa o no, debe conocer y comprender cada uno de los siguientes apartados. Este proceso se conoce como consentimiento informado. Siéntase con absoluta libertad para preguntar sobre cualquier aspecto que le ayude a aclarar sus dudas al respecto.

Una vez que haya comprendido el estudio y si usted desea participar, entonces se le pedirá que firme esta forma de consentimiento, de la cual se le entregará una copia firmada y fechada.

1. Justificación del estudio

El distrés es la causa principal de las alteraciones de la microbiota intestinal. Simultáneamente, México ocupa el primer lugar mundial de infartos del corazón a causa de factores de tensión y se conoce poco acerca de las variaciones en la microbiota intestinal mexicana. Por lo tanto, se considera pertinente iniciar la investigación con un grupo muestra de estudiantes universitarios de la Universidad Popular Autónoma del Estado de Puebla (UPAEP), que se encuentran expuestos al distrés constante. Se requiere de la identificación de los taxones microbianos alterados, para poder recomendar el consumo de “sinbióticos” preparados con bacterias del pulque y un prebiótico a base de aguamiel, apropiados para prevenir trastornos como el síndrome de intestino irritable (SII) y enfermedades como la obesidad. Algunas investigaciones han demostrado que el uso de cepas únicas o multiespecies de los géneros de Lactobacillos y Bifidobacterias, puede tener un efecto preventivo o correctivo en la microbiota intestinal, conduciendo a un equilibrio microbiano y a la mejoría en la salud de las personas. Además, tiene un impacto en trastornos psiquiátricos como la

depresión, ansiedad, falta de concentración y distrés. Entonces, probar que la ingesta de un “sinbiótico” en el grupo muestra, es trascendental ya que podría ser incluido en la dieta mexicana con el propósito de mitigar las consecuencias del distrés cotidiano. De esta manera, se crea la base de un estudio experimental para adquirir el conocimiento necesario en futuras investigaciones.

2. Objetivo del estudio

A usted se le está invitando a participar en un estudio de investigación que tiene como objetivo general:

Evaluar el efecto de los “sinbióticos” sobre la microbiota intestinal en un grupo de estudiantes mexicanos con distrés que pertenecen a la Universidad Autónoma del Estado de Puebla (UPAEP), mediante la medición de cortisol en saliva con un ensayo inmuno-enzimático (ELISA) y métodos moleculares para la caracterización de la microbiota (extracción de ADN, PCR, PCR-RT y secuenciación) para proponer formas de restablecer el equilibrio microbiano mitigando el distrés mediante el consumo de “sinbióticos”.

3. Beneficios del estudio

Diferentes investigaciones han centrado sus estudios en determinar cómo el consumo de probióticos modifica la composición de la microbiota intestinal proporcionando beneficios a la salud. Se ha comprobado que la administración de probióticos como *Lactobacillus casei shirota* durante 3 semanas mejoró el estado de ánimo y capacidad cognitiva. Además, se ha estudiado su papel en trastornos psiquiátricos donde *Lactobacillus helveticus* y *Bifidobacterium longum* reducen la angustia psicológica, la somatización, la depresión y la hostilidad, produciendo una mejora general en el estado de ánimo. Otras investigaciones reportaron sensaciones de felicidad cuando consumieron probióticos. Por lo tanto, esta investigación aportará los siguientes beneficios:

- ☐ Evaluación del impacto del consumo de una bebida “sinbiótica” multiespecies (probiótico: bacterias obtenida del pulque y prebiótico: bebida preparado a base de aguamiel) que ayude a restablecer el equilibrio en la microbiota intestinal que es alterada a causa del distrés.
- ☐ Se espera que actúen como psicobióticos en los sujetos de estudio mitigando el distrés y que tengan un impacto positivo si hay algún trastorno.
- ☐ Proporcionará nuevos conocimientos acerca de la microbiota intestinal en la población mexicana.
- ☐ Obtener una bebida innovadora “sinbiótica” multiespecie a base de bacterias de pulque y como prebiótico el aguamiel.

4. Procedimientos del estudio

En caso de aceptar participar en el estudio se le realizará una prueba de estrés académico (SISCO). Se le pedirán sus datos personales que serán protegidos.

Se le pedirá al participante una muestra de saliva con el fin de determinar la cantidad de la hormona cortisol que se libera como respuesta al estrés. Además, se le pedirá también una muestra de heces con el fin de identificar la composición de la microbiota intestinal presente, el cual se le proporcionará un frasco estéril para recolección de materia fecal. Posteriormente, se le dará un tratamiento durante dos meses que será tomado dos veces al día. Se dividirá en tres grupos la muestra para el consumo del tratamiento: Los “sinbióticos” multiespecie (grupo Sinbio), probiótico (grupo 3) y placebo grupo 1 (grupo Coco). Finalmente, se les pedirá una muestra de saliva y de heces para nuevamente evaluar el cortisol y la microbiota intestinal. Estos resultados serán analizados usando bioestadística.

5. Riesgos asociados con el estudio

Durante la fase de tratamiento con sinbióticos los sujetos pueden presentar malestar gastrointestinal, estreñimiento, diarrea y gases cuando se consumen grandes dosis. Todos estos síntomas son de carácter benigno. Algunos de los síntomas tienen un efecto temporal. En caso de que usted desarrolle algún efecto adverso secundario o requiera otro tipo de atención puede acudir a la clínica UPAEP que se encuentra ubicada 23 Sur No. 1105 colonia Santiago contacto vía teléfono: 22229400 ext. 7211.

6. Aclaraciones

- Su decisión de participar en el estudio es completamente voluntaria.
- No habrá ninguna consecuencia desfavorable para usted, en caso de no aceptar la invitación.
- Si decide participar en el estudio puede retirarse en el momento que lo desee, aun cuando el investigador responsable no se lo solicite, pudiendo informar o no, las razones de su decisión, la cual será respetada en su integridad.
- No tendrá que hacer gasto alguno durante el estudio.
- No recibirá pago por su participación.
- En el transcurso del estudio usted podrá solicitar información actualizada sobre el mismo, al investigador responsable.
- La información obtenida en este estudio, utilizada para la identificación de cada paciente, será mantenida con estricta confidencialidad por el grupo de investigadores.

- En caso de que usted desarrolle algún efecto adverso secundario no previsto, tiene derecho a una indemnización, siempre que estos efectos sean consecuencia de su participación en el estudio.
- Usted también tiene acceso a las Comisiones de Investigación y Ética de la Facultad de Medicina de la UPAEP en caso de que tenga dudas sobre sus derechos como participante del estudio a través de:

Dr. Juan Ángel Alonso Avelino

Presidente del Comité de Ética en Investigación UPAEP

juanangel.alonso@upaep.mx

- Si considera que no hay dudas ni preguntas acerca de su participación, puede, si así lo desea, firmar la Carta de Consentimiento Informado que forma parte de este documento.

7. Carta de consentimiento informado

Yo, _____ he leído y comprendido la información anterior y mis preguntas han sido respondidas de manera satisfactoria. He sido informado y entiendo que los datos obtenidos en el estudio pueden ser publicados o difundidos con fines científicos. Convengo en participar en este estudio de investigación. Recibiré una copia firmada y fechada de esta forma de consentimiento.

Firma del participante o del padre o tutor

Fecha

Testigo 1

Fecha

Testigo 2

Fecha

Esta parte debe ser completada por el Investigador (o su representante):

He explicado al Sr(a). _____ la naturaleza y los propósitos de la investigación; le he explicado acerca de los riesgos y beneficios que implica su participación. He contestado a las preguntas en la medida de lo posible y he preguntado si tiene alguna duda. Acepto que he leído y conozco la normatividad correspondiente para realizar investigación con seres humanos y me apegó a ella.

Una vez concluida la sesión de preguntas y respuestas, se procedió a firmar el presente documento.

Firma del investigador

Fecha

Quedo de usted:

Dra. Beatriz Pérez Armendáriz

M.C. Laura Márquez Morales

beatriz.perez@upaep.mx

laura.marquez@upaep.edu.mx

8. Carta de revocación del consentimiento

Título del protocolo: Efecto de los “sinbióticos” en la microbiota intestinal en una población de estudiantes mexicanos con estrés que pertenecen a la Universidad Popular Autónoma del Estado de Puebla

Investigador principal: Laura Márquez Morales

Sede donde se realizará el estudio: Universidad Popular Autónoma del Estado de Puebla

Nombre _____ del _____ participante:

Por este conducto deseo informar mi decisión de retirarme de este protocolo de investigación por las siguientes razones: (Este apartado es opcional y puede dejarse en blanco si así lo desea el paciente)

Si el paciente así lo desea, podrá solicitar que le sea entregada toda la información que se haya recabado sobre él, con motivo de su participación en el presente estudio.

Firma del participante o del padre o tutor	Fecha

Testigo	Fecha

Testigo	Fecha

Anexo 3. Instrumentos de medición

A) Inventario del estrés académico SISCO



Proyecto de investigación: Efecto de los “simbióticos” en la disbiosis de la microbiota intestinal en estudiantes mexicanos con estrés que pertenecen a la Universidad Popular Autónoma del Estado de Puebla

Márquez Morales Laura, Pérez Armendáriz Beatriz, Cavazos Arroyo Judith, Girgis EL Kassis Elie Martínez Gutiérrez Fidel

laura.marquez@upaep.mx, beatriz.perez@upaep.mx

Ficha de identificación

Nombre completo: _____ Edad: _____ Sexo: _____
Fecha: _____ E-mail: _____ Tel. de contacto: _____
Ocupación: _____ Edo. Civil: _____ Fecha de nacimiento: _____

Inventario SISCO para reconocer las características del estrés académico

El presente cuestionario tiene como objetivo central identificar las características del estrés que suele acompañar a los estudiantes mexicanos de la Universidad Popular Autónoma del Estado de Puebla. La sinceridad con que responda a los cuestionamientos será de gran utilidad para la investigación. La información que se proporcione será totalmente confidencial y solo se manejarán resultados globales.

1.- Durante el transcurso de este periodo de estudios (verano) ¿has tenido momentos de preocupación o nerviosismo?

☐ Si ☐ No

En caso de seleccionar la alternativa “no”, el cuestionario se da por concluido, en caso de seleccionar la alternativa “si”, pasar a la pregunta número dos y continuar con el resto de las preguntas.

2.- Con la idea de obtener mayor precisión y utilizando una escala del 1 al 5 señala tu nivel de preocupación o nerviosismo, donde (1) es poco y (5) mucho.

1	2	3	4	5

3.- En una escala del (1) al (5) donde (1) es nunca, (2) es rara vez, (3) es algunas veces, (4) es casi siempre y (5) es siempre, señala con qué frecuencia te inquietaron las siguientes situaciones:

	Nunca (1)	Rara vez (2)	Algunas veces (3)	Casi siempre (4)	Siempre (5)
Demandas del entorno					
La competencia con los compañeros del grupo					
Sobrecarga de tareas y trabajos escolares					

La personalidad y el carácter del profesor					
Las evaluaciones de los profesores (exámenes, ensayos, trabajos de investigación, etc.)					
El tipo de trabajo que te piden los profesores (consulta de temas, fichas de trabajo, ensayos, mapas conceptuales, etc.)					
No entender los temas que se abordan en la clase					
Participación en clase (responder a preguntas, exposiciones, etc.)					
Tiempo limitado para hacer el trabajo					
Otra (Especifique)					

4.- En una escala del (1) al (5) donde (1) es nunca, (2) es rara vez, (3) es algunas veces, (4) es casi siempre y (5) es siempre, señala con qué frecuencia tuviste las siguientes reacciones físicas, psicológicas y comportamentales cuando estabas preocupado o nervioso.

Reacciones físicas	Nunca (1)	Rara vez (2)	Algunas veces (3)	Casi siempre (4)	Siempre (5)
Trastornos en el sueño (insomnio o pesadillas)					
Fatiga crónica (cansancio permanente)					
Dolores de cabeza o migrañas					
Problemas de digestión, dolor abdominal o diarrea					
Rascarse, morderse las uñas, frotarse, etc.					
Somnolencia o mayor necesidad de dormir					
Reacciones psicológicas (depresión, ansiedad)					

Reacciones psicológicas	Nunca (1)	Rara vez (2)	Algunas veces (3)	Casi siempre (4)	Siempre (5)
Inquietud (incapacidad de relajarse y estar tranquilo)					
Sentimientos de depresión y tristeza (decaído)					
Ansiedad, angustia o desesperación.					
Problemas de concentración					
Sentimiento de agresividad o aumento de irritabilidad					
Reacciones comportamentales					

Reacciones comportamentales	Nunca (1)	Rara vez (2)	Algunas veces (3)	Casi siempre (4)	Siempre (5)
Conflictos o tendencia por polemizar o discutir					
Aislamiento de los demás					
Desgano para realizar las labores escolares					
Aumento o reducción del consumo de alimentos					
Otras (especifique)					

5.- En una escala del (1) al (5) donde (1) es nunca, (2) es rara vez, (3) es algunas veces, (4) es casi siempre y (5) es siempre señala con qué frecuencia utilizaste las siguientes estrategias para enfrentar la situación que te causaba la preocupación y el nerviosismo

Reacciones comportamentales	Nunca (1)	Rara vez (2)	Algunas veces (3)	Casi siempre (4)	Siempre (5)
Habilidad asertiva (defender nuestras preferencias o sentimientos sin dañar a otros)					
Elaboración de un plan y ejecución de sus tareas					
Elogios así mismos					
La religiosidad (oraciones o asistencia a misas)					
Búsqueda de información sobre la situación					
Ventilación o confidencias (verbalización de la situación que preocupa)					
Otras (especifique)					

B) Historia clínica



Proyecto de investigación: Efecto de los "sibbióticos" en la diátesis de la microbiota
intestinal en estudiantes mexicanos con estrés que pertenecen a la Universidad

Popular Autónoma del Estado de Puebla

Márquez Morales Laura, Pérez Amendóriz Beatriz, Carrasco Arroyo Judith, Gómez EL Kassis Elie
Martínez Gutiérrez Fidel

laura.marques@upaep.mx beatriz.peres@upaep.mx

Historia clínica



Ficha de identificación

Nombre completo: _____ Edad: _____ Sexo: _____

Fecha: _____ E-mail: _____ Tel. de contacto: _____

Ocupación: _____ Edo. Civil: _____ Fecha de nacimiento: _____

Antecedentes patológicos familiares

Enfermedad	Familiar	Enfermedad	Familiar	Enfermedad	Familiar
Osteoporosis		Cáncer		Embarazo	
HIA		Diplopía		Depresión	
Diabetes		E. cardiovascular		Otros	

Antecedentes personales no patológicos

Alcohol Sí(____) No (____) Drogas Sí(____) No (____) Zoonosis Sí(____) No Especificar: _____

Fumar Sí(____) No (____) Horas de sueño _____ Vegetariano Sí(____) No (____)
Especificar: _____

Antecedentes patológicos personales

Cirugías Sí(____) No (____) ¿Cuáles? _____

Medicamentos actuales: _____

Intolerancia (alimentos): _____ Alergias (alimentos/medicamentos): _____

Enfermedades diagnosticadas actuales: _____

Síntomas actuales en este mes

Diarrea Sí(____) No (____) **Habituencia** Sí(____) No (____) **Distensión ab.** Sí(____) No (____)
Náuseas Sí(____) No (____)
Estreñimiento Sí(____) No (____) **Vómito** Sí(____) No (____) **Alteraciones del apetito** Sí(____) No (____)
Fiebris Sí(____) No (____) **Mareos** Sí(____) No (____) **Hinchazón (S)** Sí(____) No (____)
Borborigmos Sí(____) No (____)
Mucus en las heces Sí(____) No (____) **Dolor abdominal** Sí(____) No (____) **Intermittente** (____) **Discontinuo** (____)
Sangre en heces Sí(____) No (____) **Urgencia defecatoria** Sí(____) No (____)
Sensación de defecación incompleta Sí(____) No (____) **Otros** Sí(____) No (____)

Antecedentes psiquiátricos

Estrés Sí(____) No (____) **Ansiedad** Sí(____) No (____) **Depresión** Sí(____) No (____) **Otro:**

Medicamentos:

Historia dental

Dentadura completa Sí(____) No (____) **Caries** Sí(____) No (____) **Otros:**

Problemas de masticación y/o deglución Sí(____) No (____) **Fecha última revisión:**

Problemas de salivación: Si (____) No (____)

Actividad física

Actividad/deporte: _____ **Horas a la semana:** _____ **¿Cuántos días a la semana?** _____

Duración (min/día): _____

Nivel de actividad Física

1. **Muy sedentaria** (____)

Actividades en posición sentada o de pie como pintar, manejar, planchar, cocinar, trabajo de oficina.

2. **Sedentaria** (____)

Actividades de pie, en ambiente cerrado y templado a la intemperie sin mayor desgaste como caminata moderada, trabajos en restaurante, golf, tenis de mesa, cuidado de niños.

3. Moderada (____)

Actividades al aire libre con constante desgaste como caminata intensa, llevar una carga, ciclismo, esquiar, tenis, bailar.

4. Activa (____)

Actividades a la intemperie, con intenso desgaste como caminatas en pendiente hacia arriba, básquetbol, fútbol.

Nacimiento

Parto normal: Si ____ No ____ Cesárea: Si ____ No ____ Leche materna: ____
Leche de fórmula: ____ Lugar de nacimiento: ____ Años que vivió en ese lugar: ____

Consumo de Probióticos

En los últimos tres meses ha consumido probióticos: Si ____ No: ____

¿Cuál o cuáles? _____ ¿Cuánto? _____

¿Por qué?

Anexo 4. Confidencialidad de los Investigadores

Carta de confidencialidad

Puebla, Pue., a 12 de junio del 2017.

C. Dra., Beatriz Pérez Armendáriz, (directora de la Facultad de Biotecnología) con Registro Federal de Contribuyentes número (PEAB651001676), con domicilio ubicado en 13 poniente No. 1927 Col. Barrio de Santiago C.P. 72410, me comprometo a resguardar, mantener la confidencialidad y no hacer mal uso de los documentos, expedientes, reportes, estudios, actas, resoluciones, oficios, correspondencia, acuerdos, directivas, directrices, circulares, contratos, convenios, instructivos, notas, memorandos, archivos físicos y/o electrónicos, estadísticas o bien, cualquier otro registro o información que documente o recabe durante la ejecución del estudio de investigación bajo el Protocolo de investigación titulado Efecto de los “simbióticos” en la disbiosis de la microbiota intestinal en estudiantes mexicanos con estrés que pertenecen a la Universidad Popular Autónoma del Estado de Puebla, a que tenga acceso en mi carácter de miembro del Grupo de Investigadores instalado en la Facultad de Biotecnología bajo la responsabilidad del Establecimiento denominado Decanato de Ciencias Biológicas de la Universidad Popular Autónoma del Estado de Puebla, así como a no difundir, distribuir o comercializar con los datos personales contenidos en los sistemas de información, desarrollados en el ejercicio de mis funciones como investigador de la Facultad de Biotecnología.

Estando en conocimiento de que en caso de no dar cumplimiento se estará acorde a la sanciones civiles, penales o administrativas que procedan de conformidad con lo dispuesto en la Ley Federal de Transparencia y Acceso a la Información Pública Gubernamental, la Ley Federal de Protección de Datos Personales en Posesión de los Particulares y el Código Penal del Distrito Federal, y sus correlativas en las entidades federativas, a la Ley Federal de Protección de Datos Personales en Posesión de los Particulares, y demás disposiciones aplicables en la materia.

Acepto

Beatriz Pérez Armendáriz

Directora Facultad Biotecnología

Decanato de Ciencias Biológicas

Universidad Popular Autónoma del Estado de Puebla

C.c.p

Anexos 5. Análisis estadísticos

A-1 Cálculo de rendimiento bacteriano de Bacteroidetes, firmicutes y Gammaproteobacterias

BACTEROIDETES					BACTEROIDETES					CLAVE DE LA TABLA	
Rendimiento de ADN bacteriano					Rendimiento del ADN bacteriano					DT	Después del tratamiento
	DT	AT	(DT-AT)	%		DTPL	ATPL	DTPL-ATPL	%	AT	Antes del tratamiento
										M	Sujeto que tomo bebida
										P	Sujeto que tomo placebo
M1	555178	385898	169280	30.5	P1	523938	591014	-67076	-12.8		
M2	1560128	275156	1284971	82.4	P2	72118	62905	9213	12.8		
M3	4273861	271358	4002503	93.7	P3	546248	589646	-43398	-7.9		
M4	1127987	50830	1077156	95.5	P4	208858	313999	-105141	-50.3		
M5	1357667	550058	807609	59.5	P5	1320443	1284241	36203	2.7		
M6	6134432	547515	5586918	91.1	P6	47638	50012	-2375	-5.0		
M7	262090	105206	156884	59.9	P7	108423	93482	14941	13.8		
M8	959126	96118	863009	90.0	P8	247342	294277	-46935	-19.0		
M9	1536692	78391	1518302	95.1	P9	1217603	1133225	84378	6.9		
M10	521516	134802	386714	74.2	P10	64082	62325	1757	2.7		
M11	100443	32429	68014	67.7	P11	7966	7127	838	10.5		
M12	2008291	172323	1835968	91.4	P12	186446	223372	-36927	-19.8		
M13	1037729	34442	1003286	96.7	P13	149267	179661	-30394	-20.4		
M14	383225	344487	38738	10.1	P14	16411	18902	-2491	-15.2		
M15	1064513	328990	735623	69.1	P15	211292	198480	12811	6.1		
M16	1672413	166824	1505589	90.0	P16	1275346	1141128	134218	10.5		
M17	226499	107672	118827	52.5	P17	46439	71453	-25014	-53.9		
M18	580161	89872	490289	84.5	P18	18257	17921	335	1.8		
M19	1079413	131410	948003	87.8				Promedio	-2.0		
M20	454890	109686	345204	75.9				DVST	12.3		
M21	721313	251386	469927	65.1							
M22	395858	183022	212836	53.8							
M23	1198017	63197	1134820	94.7							
M24	666677	187311	479366	71.9							
M25	649903	103514	546389	84.1							
M26	503704	251386	252318	50.1							
M27	1308264	231271	1076993	82.3							
			Promedio	78.4							
			DVST	15.0							

FIRMICUTES					FIRMICUTES					CLAVES DE LA TABLA	
Rendimiento de ADN					Rendimiento de ADN					DT	Después del tratamiento
	DTX	ATX	(DTX-ATX)	%		DPL	APL	DPL-APL	%	AT	Antes del tratamiento
										M	Sujeto que tomo bebida
										P	Sujeto que tomo placebo
M1	113303357	10741615	102561742	90.5	P1	4199046	32288532	9707513.4	23.12		
M2	111371575	311632	111059942	99.7	P2	28138501	21057402	7081099.6	25.17		
M3	89169923	1624092	87545831	98.2	P3	39982511	16229742	23752769	59.41		
M4	98498252	1177184	97321067	98.8	P4	48427224	47368248	1058975.8	2.19		
M5	109472729	24582188	84890540	77.5	P5	34587723	45208063	-10620340	-30.71		
M6	95312740	32004553	62308187	73.0	P6	4296449	12417029	-8120580	-189.01		
M7	60707999	25820157	34887842	57.5	P7	1450104	9880953	15632513	13.71		
M8	61809462	1811733	60417729	96.1	P8	17060065	6852102	4853893.1	41.47		
M9	68054610	427833	67626776	99.4	P9	5027966	5178397	-150430.9	-2.99		
M10	84478506	9760225	74718281	88.4	P10	7862690	6030373	1832317.5	23.30		
M11	146106206	101157	146005050	99.9	P11	21794235	6853050	15141184	69.47		
M12	111645514	5242397	106403117	95.3	P12	97295785	23634688	73661077	75.71		
M13	49753731	3175988	46577743	93.6	P13	5971404	6349644	-378240	-6.33		
M14	50492533	19180589	31311944	62.0	P14	3952159	3735041	217118.46	5.49		
M15	50245055	14389069	35855986	71.4	P15	3875245	312399	3562845.8	91.94		
M16	50368642	66158859	-15790217	-31.3	P16	4296449	4751746	-455297.3	-10.60		
M17	53822888	374827329	-321004442	-596.4	P17	4296448	456052	3840396	89.39		
M18	45152567	271018061	-225865494	-500.2	P18	1236468	1018348	218119.41	17.64		
M19	131459278	172815	131286463	99.9				Promedio	20.4		
M20	141861864	6412348	135449517	95.5				DesvStan	30.4		
M21	113721650	26980373	86741276	74.5							
M22	5713102	61307497	-55594395	-973.1							
M23	82125245	1610187	80515058	98.0							
M24	3172089	46305056	-43732966	-1378.7							
M25	32607385	9688557	22918828	70.3							
M26	44273832	8695904	35577928	80.4							
M27	23926791	149865	23776926	99.4							
			Promedio	87.3							
			DesvStan	13.8							

GAMMAPROTEOBACTERIAS					GAMMAPROTEOBACTERIAS					CLAVES DE LA TABLA	
Rendimiento de ADN					Rendimiento de ADN					DT	Despues del tratamiento
	DTX	ATX	DTX-ATX	%		DPL	APL	[DPL-APL]	%	AT	Antes del tratamiento
M1	1631129	1785811	-154682	-9.48	P1	14982347	13841518	1140828.8	7.61	M	Sujeto que tomo bebida
M2	249692	280179	-30487	-12.21	P2	2293485.3	4426780.8	-2133295.5	-93.02	P	Sujeto que tomo placebo
M3	567379	550280	17099	3.01	P3	517923.7	113639.13	404284.6	78.06		
M4	4931645	491181	-59536	-1.21	P4	211585.24	194071.75	17513.5	8.28		
M5	4931645	5146272	-214627	-4.35	P5	990121.76	987748.32	2373.4	0.24		
M6	618581	558262	60319	9.75	P6	3532736	3044305	4884310	13.83		
M7	19697124	19708946	-11822	-0.06	P7	6135383.9	6062199.2	73184.6	1.19		
M8	6314652	6250570	64082	1.01	P8	1143475.9	1168443.6	-24967.8	-2.18		
M9	96065	83282	12784	13.31	P9	490109.05	461567.32	28541.7	5.82		
M10	272879	352140	-79261	-29.05	P10	4826263.9	4070120.7	756143.2	15.67		
M11	26223	24270	1953	7.45	P11	4826263.9	5325319.2	-499055.3	-10.34		
M12	7523810	6826313	696897	9.26	P12	5989887.6	5819839.3	170048.3	2.84		
M13	40563652	36084833	4478829	11.04	P13	9450547.2	9138284.2	312263.0	3.30		
M14	82190	71983	10207	12.42	P14	1199701.3	1246665.8	-46964.5	-3.91		
M15	4416169	4094615	321555	7.28	P15	5847841.7	5573775.5	274066.2	4.69		
M16	26504804	26909319	1595486	5.60	P16	9680104	8900190.2	779913.8	8.06		
M17	459357	426166	33192	7.23	P17	11179398	15531538	-4352139.4	-38.93		
M18	2068601	1760280	308322	14.90	P18	14910604	14732746	177858.0	1.19		
M19	1359168	126176	37452	7.17				Promedio	1.08		
M20	3549734	3353058	196676	5.54				Desv Stan	12.46		
M21	4556126	4221847	334279	7.34							
M22	1581024	1637995	-56971	-3.60							
M23	4079901	3341008	738892	18.11							
M24	159785	150029	9756	6.11							
M25	8143928	8041958	101970	1.25							
M26	1378881	1537984	-159103	-11.54							
M27	897334	1056772	-159439	-17.66							
			Promedio	2.17							
			DesvStan	10.73							

A-2 Resumen estadístico de los tres filos

		Mediana	p	significativamente diferente P< 0.05	Spearman	p	relación significativa Mann-Whitney	Mediana A	Mediana B	diferencia	actorencia	Hodges-Lehmann
AGAP	Bacteroidetes ATX vs DTX	607495	< 0.0001	si	0.0692	0.386	si					
COPLA	Bacteroidetes ATX vs DTX	1020	0.5798	no	0.9732	< 0.0001	no					
AGAP vs COPLA	Bacteroidetes ATX		0.734	NO				168	177673	167857	-9816	-16388
AGAP vs COPLA	Bacteroidetes DTX		0.0004	si				63	840220	189071	-851149	-489645
AGAP	Firmicutes ATX vs DTX	6.40E+07	0.0049	si	-0.5498	0.006	NO					
COPLA	Firmicutes ATX vs DTX	134E+06	0.0385	si	0.3065	< 0.0001	no					
AGAP vs COPLA	Firmicutes ATX		0.8223	no				172	10250000	6753000	-3498000	-562776
AGAP vs COPLA	Firmicutes DTX		0.0004	si				63	6.48E+07	9656000	-5.52E+07	-46580000
AGAP	maproteobacterias ATX vs DTX	-262167	0.7012	no	0.3152	0.088	si					
COPLA	maproteobacterias ATX vs DTX	50863	0.2842	no	0.9757	< 0.0001	no					
AGAP vs COPLA	maproteobacterias ATX		0.9124	no				176	2834000	4876000	2042000	105661
AGAP vs COPLA	maproteobacterias ATX vs DTX		0.214	no				137	2590000	4826000	2236000	1044000
		Mediana	p	significativamente diferente P< 0.05	Spearman	p	relación significativa					
AGAP	Bacteroidetes ATX vs DTX	607495	< 0.0001	si	0.0692	0.386	si					
COPLA	Bacteroidetes ATX vs DTX	1020	0.5798	no	0.9732	< 0.0001	no					
AGAP	Firmicutes ATX vs DTX	64020000	0.0049	si	-0.5498	0.006	no					
COPLA	Firmicutes ATX vs DTX	1341000	0.0385	si	0.3065	< 0.0001	no					
AGAP	maproteobacterias ATX vs DTX	-262167	0.7012	no	0.3152	0.088	si					
COPLA	maproteobacterias ATX vs DTX	50863	0.2842	no	0.9757	< 0.0001	no					

A-3 Pruebas estadísticas de la phyla Bacteroidetes, Firmicutes y Gammaproteobacterias

Table Analyzed

Column C

vs.

Column A

Wilcoxon matched-pairs signed rank test

P value

Exact or approximate P value?

Pruebas Bacteroidetes

S_DTX

vs.

S_ATX

< 0.0001

Exact

P value summary	****
Significantly different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of positive, negative ranks	378.0 , 0.0
Sum of signed ranks (W)	378.0
Median of differences	
Median	735623
How effective was the pairing?	
rs (Spearman)	0.2345
P value (one tailed)	0.1196
P value summary	ns
Significant correlation? (P > 0.05)	Yes

Table Analyzed	Pruebas Bacteroidetes
Column D	P_DTX
vs.	vs.
Column B	P_ATX
Wilcoxon matched-pairs signed rank test	
P value	0.5798
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	ns
Significantly different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of positive, negative ranks	99.00 , -72.00
Sum of signed ranks (W)	27.00
Median of differences	
Median	1020
How effective was the pairing?	
rs (Spearman)	0.9732
P value (one tailed)	< 0.0001
P value summary	****
Significant correlation? (P > 0.05)	No

Table Analyzed	Pruebas Bacteroidetes
Column B	P_ATX
vs.	vs.
Column A	S_ATX
Mann Whitney test	
P value	0.8410
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	ns
Significantly different? (P < 0.05)	No

One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column A,B	630.0 , 405.0
Mann-Whitney U	234.0
Difference between medians	
Median of column A	166824
Median of column B	167857
Difference: Actual	1033
Difference: Hodges-Lehmann	-10223

Table Analyzed	Pruebas Bacteroidetes
Column D	P_DTX
vs.	vs.
Column C	S_DTX
Mann Whitney test	
P value	0.0001
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	***
Significantly different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column C,D	780.0 , 255.0
Mann-Whitney U	84.00
Difference between medians	
Median of column C	959126
Median of column D	189071
Difference: Actual	-770056
Difference: Hodges-Lehmann	-533781

Table Analyzed	Pruebas Firmicutes
Column C	S_DTX
vs.	vs.
Column A	S_ATX
Wilcoxon matched-pairs signed rank test	
P value	0.0056
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	**
Significantly different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of positive, negative ranks	282.0 , -69.00
Sum of signed ranks (W)	213.0
Median of differences	
Median	6.136e+007
How effective was the pairing?	

rs (Spearman)	-0.2615
P value (one tailed)	0.0984
P value summary	ns
Significant correlation? (P > 0.05)	Yes

Table Analyzed	Pruebas Firmicutes
Column D	P_DTX
vs.	vs.
Column B	P_ATX
Wilcoxon matched-pairs signed rank test	
P value	0.0385
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	*
Significantly different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of positive, negative ranks	133.0 , -38.00
Sum of signed ranks (W)	95.00
Median of differences	
Median	1.701e+006
How effective was the pairing?	
rs (Spearman)	0.8925
P value (one tailed)	< 0.0001
P value summary	****
Significant correlation? (P > 0.05)	No

Table Analyzed	Pruebas Firmicutes
Column B	P_ATX
vs.	vs.
Column A	S_ATX
Mann Whitney test	
P value	0.8141
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	ns
Significantly different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column A,B	595.0 , 395.0
Mann-Whitney U	224.0
Difference between medians	
Median of column A	9.724e+006
Median of column B	6.753e+006
Difference: Actual	-2.972e+006
Difference: Hodges-Lehmann	-728406

Table Analyzed	Pruebas Firmicutes
Column D	P_DTX
vs.	vs.
Column C	S_DTX
Mann Whitney test	
P value	< 0.0001
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	****
Significantly different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column C,D	764.0 , 226.0
Mann-Whitney U	55.00
Difference between medians	
Median of column C	7.509e+007
Median of column D	9.656e+006
Difference: Actual	-6.543e+007
Difference: Hodges-Lehmann	-5.102e+007

Table Analyzed	Pruebas Gamma
Column C	S_DTX
vs.	vs.
Column A	S_ATX
Wilcoxon matched-pairs signed rank test	
P value	0.0731
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	ns
Significantly different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of positive, negative ranks	264.0 , -114.0
Sum of signed ranks (W)	150.0
Median of differences	
Median	17099
How effective was the pairing?	
rs (Spearman)	0.9986
P value (one tailed)	< 0.0001
P value summary	****
Significant correlation? (P > 0.05)	No

Table Analyzed	Pruebas Gamma
Column D	P_DTX

vs.	vs.
Column B	P_ATX
Wilcoxon matched-pairs signed rank test	
P value	0.2121
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	ns
Significantly different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of positive, negative ranks	115.0 , -56.00
Sum of signed ranks (W)	59.00
Median of differences	
Median	121617
How effective was the pairing?	
rs (Spearman)	0.9757
P value (one tailed)	< 0.0001
P value summary	****
Significant correlation? (P > 0.05)	No

	Pruebas
Table Analyzed	Gamma
Column B	P_ATX
vs.	vs.
Column A	S_ATX
Mann Whitney test	
P value	0.2083
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	ns
Significantly different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column A,B	566.0 , 469.0
Mann-Whitney U	188.0
Difference between medians	
Median of column A	1.760e+006
Median of column B	4.876e+006
Difference: Actual	3.116e+006
Difference: Hodges-Lehmann	1.100e+006

	Pruebas
Table Analyzed	Gamma
Column D	P_DTX
vs.	vs.
Column C	S_DTX

Mann Whitney test	
P value	0.1986
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	ns
Significantly different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column C,D	565.0 , 470.0
Mann-Whitney U	187.0
Difference between medians	
Median of column C	1.631e+006
Median of column D	4.826e+006
Difference: Actual	3.195e+006
Difference: Hodges-Lehmann	1.053e+006

Number of values	27	18	27	18
Minimum	32429	7966	100443	7127
25% Percentile	96118	47338	503704	59247
Median	166824	167857	959126	189071
75% Percentile	271358	529515	1357667	589988
Maximum	550058	1320443	6134433	1284241
Range	517628	1312477	6033990	1277114
Mean	195721	348229	1200000	351843
Std. Deviation	140366	452148	1279822	422599
Std. Error of Mean	27014	106572	246302	99607

Number of values	26	18	26	18
Minimum	101157	312399	3172089	1236468
25% Percentile	1505574	4497570	48603440	4296449
Median	9724391	6752577	75089930	9656395
75% Percentile	26610213	21701723	109947425	35936418
Maximum	374827300	47368250	146106200	97295770
Range	374726143	47055851	142934111	96059302
Mean	39095553	13856762	74227525	20899637
Std. Deviation	86769597	14599977	38261585	24558621
Std. Error of Mean	17016918	3441248	7503714	5788523

Number of values	27	18	27	18
Minimum	24270	113639	26223	211585
25% Percentile	426166	1123270	459357	1105137
Median	1760280	4876050	1631129	4826264
75% Percentile	5146273	8959714	4931645	9507936

Maximum	36084830	15531540	40563660	14982350
Range	36060560	15417901	40537437	14770765
Mean	5203951	5591042	5505981	5455988
Std. Deviation	8676441	5026705	9453177	4822117
Std. Error of Mean	1669782	1184806	1819265	1136584
Table Analyzed	Pruebas de porcentaje de cambio			
Column B	P_Bacter			
vs.	vs.			
Column A	S_Bacter			
Mann Whitney test				
P value	< 0.0001			
Exact or approximate P value?	Exact			
P value summary	****			
Significantly different? (P < 0.05)	Yes			
One- or two-tailed P value?	Two-tailed			
Sum of ranks in column A,B	725.0 , 136.0			
Mann-Whitney U	0.0			
Difference between medians				
Median of column A	82.36			
Median of column B	2.289			
Difference: Actual	-80.07			
Difference: Hodges-Lehmann	-80.92			

Table Analyzed	Pruebas de porcentaje de cambio			
Column D	P_Firmicu			
vs.	vs.			
Column C	S_Firmicu			
Mann Whitney test				
P value	< 0.0001			
Exact or approximate P value?	Exact			
P value summary	****			
Significantly different? (P < 0.05)	Yes			
One- or two-tailed P value?	Two-tailed			
Sum of ranks in column C,D	574.0 , 129.0			
Mann-Whitney U	9.000			
Difference between medians				
Median of column C	94.46			
Median of column D	17.64			
Difference: Actual	-76.82			
Difference: Hodges-Lehmann	-72.89			

Table Analyzed	Pruebas de porcentaje de cambio			
----------------	---------------------------------	--	--	--

Column F	P_Gamma
vs.	vs.
Column E	S_Gamma
Mann Whitney test	
P value	0.8088
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	ns
Significantly different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column E,F	604.0 , 342.0
Mann-Whitney U	206.0
Difference between medians	
Median of column E	5.597
Median of column F	3.072
Difference: Actual	-2.526
Difference: Hodges-Lehmann	-0.9808

Table Analyzed	Pruebas de porcentaje de cambio
Kruskal-Wallis test	
P value	< 0.0001
Exact or approximate P value?	Approximate
P value summary	****
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	Yes
Number of groups	3
Kruskal-Wallis statistic	53.20
Data summary	
Number of treatments (columns)	3
Number of values (total)	74

Table Analyzed	Pruebas de porcentaje de cambio
Kruskal-Wallis test	
P value	0.0448
Exact or approximate P value?	Approximate
P value summary	*
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	Yes
Number of groups	3
Kruskal-Wallis statistic	6.210
Data summary	
Number of treatments (columns)	3
Number of values (total)	47

Table Analyzed	Pruebas de porcentaje de cambio
Column C	S_Firmicu
vs.	vs.
Column A	S_Bacter
Mann Whitney test	
P value	0.0136
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	*
Significantly different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column A,C	485.0 , 643.0
Mann-Whitney U	160.0
Difference between medians	
Median of column A	82.36
Median of column C	94.46
Difference: Actual	12.10
Difference: Hodges-Lehmann	8.155

Table Analyzed	Pruebas de porcentaje de cambio
Column E	S_Gamma
vs.	vs.
Column C	S_Firmicu
Mann Whitney test	
P value	< 0.0001
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	****
Significantly different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column C,E	847.0 , 378.0
Mann-Whitney U	0.0
Difference between medians	
Median of column C	94.46
Median of column E	5.597
Difference: Actual	-88.86
Difference: Hodges-Lehmann	-87.51

Table Analyzed	Pruebas de porcentaje de cambio
Column E	S_Gamma
vs.	vs.
Column A	S_Bacter

Mann Whitney test	
P value	< 0.0001
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	****
Significantly different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column A,E	1000 , 378.0
Mann-Whitney U	0.0
Difference between medians	
Median of column A	82.36
Median of column E	5.597
Difference: Actual	-76.77
Difference: Hodges-Lehmann	-77.76

Table Analyzed	Pruebas de porcentaje de cambio
Column D	P_Firmicu
vs.	vs.
Column B	P_Bacter
Mann Whitney test	
P value	0.0186
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	*
Significantly different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column B,D	197.0 , 299.0
Mann-Whitney U	61.00
Difference between medians	
Median of column B	2.289
Median of column D	17.64
Difference: Actual	15.35
Difference: Hodges-Lehmann	17.30

Table Analyzed	Pruebas de porcentaje de cambio
Column F	P_Gamma
vs.	vs.
Column D	P_Firmicu
Mann Whitney test	
P value	0.0701
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	ns
Significantly different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed

Sum of ranks in column D,F	286.0 , 210.0
Mann-Whitney U	74.00
Difference between medians	
Median of column D	17.64
Median of column F	3.072
Difference: Actual	-14.57
Difference: Hodges-Lehmann	-15.15
Table Analyzed	Pruebas de porcentaje de cambio
Column F	P_Gamma
vs.	vs.
Column B	P_Bacter
Mann Whitney test	
P value	0.4618
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	ns
Significantly different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column B,F	244.0 , 284.0
Mann-Whitney U	108.0
Difference between medians	
Median of column B	2.289
Median of column F	3.072
Difference: Actual	0.7826
Difference: Hodges-Lehmann	2.826

Table Analyzed	Pruebas Firmucutes/Bacteroidetes
Column B	S_ATX
vs.	vs.
Column A	S_DTX
Wilcoxon matched-pairs signed rank test	
P value	0.0484
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	*
Significantly different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of positive, negative ranks	52.00 , -158.0
Sum of signed ranks (W)	-106.0
Median of differences	
Median	-30.56
How effective was the pairing?	
rs (Spearman)	0.3323
P value (one tailed)	0.0761
P value summary	ns

Significant correlation? ($P > 0.05$) Yes

Table Analyzed	Pruebas Firmucutes/Bacteroidetes
Column D	P_ATX
vs.	vs.
Column C	P_DTX
Wilcoxon matched-pairs signed rank test	
P value	0.1594
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	ns
Significantly different? ($P < 0.05$)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of positive, negative ranks	46.00 , -107.0
Sum of signed ranks (W)	-61.00
Median of differences	
Median	-12.08
How effective was the pairing?	
rs (Spearman)	0.9093
P value (one tailed)	< 0.0001
P value summary	****
Significant correlation? ($P > 0.05$)	No

A-4 Pruebas estadísticas del Inventario del estrés académico SISCO

Pregunta 2 Preocupacion o Nerviosismo "SI o No" * Placebo y simbiótico

Tabla cruzada

Recuento		Placebo y simbiótico		Total
		Placebo	Simbiótico	
Pregunta 2 Preocupacion o Nerviosismo "SI o No"	0	0	13	13
	POCO	1	7	8
	ALGO	3	1	4
	MEDIANAMENTE	10	6	16
	BASTANTE	2	0	2
	MUCHO	2	0	2
Total		18	27	45

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Significación asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	22.604 ^a	5	.000
Razón de verosimilitud	28.874	5	.000
Asociación lineal por lineal	19.963	1	.000
N de casos válidos	45		

a. 8 casillas (66.7%) han esperado un recuento menor que 5. El recuento mínimo esperado es .80.

FREQUENCIES VARIABLES=P2aPSN_inicial PLA
/BARChart PERCENT

	Placebo							
	Placebo				Simbiótico			
	Medición				Medición			
	Antes		Después		Antes		Después	
	Med	Desv	Medi	Desv	Medi	Desv	Me	Desv
	ia	iació	a	iació	a	iació	dia	iació
		n		n		n		n
		están		están		están		están
		dar		dar		dar		dar
Pregunta 3a Competencia con Compañeros de Grupo	2.44	.86	1.67	.91	2.89	.80	1.00	1.11

Pregunta 3b Sobrecarga de Tareas y Trabajos	3.67	.84	2.78	1.35	4.00	.62	1.4 1	1.60
Pregunta 3c Personalidad y Carácter del Profesor	2.28	.83	2.83	1.34	2.89	.93	1.7 0	1.79
Pregunta 3d Evaluaciones de los Profesores	3.56	1.10	2.89	1.64	4.11	.70	1.3 0	1.54
Pregunta 3e El tipo de Trabajo que piden los Profesores	3.06	.87	2.50	1.29	3.37	.84	1.5 6	1.80
Pregunta 3f No Entender los Temas	2.89	1.08	2.50	1.10	3.44	1.01	1.4 4	1.60
Pregunta 3g Participacion en Clase	2.39	1.33	2.17	1.42	3.11	1.05	1.3 0	1.46
Pregunta 3h Tiempo Limipato para hacer el Trabajo	3.00	1.08	2.61	1.46	3.85	.95	1.3 7	1.71
Pregunta 4a Transtornos del sueño	2.06	.80	1.61	.98	2.81	1.11	.85	1.06
Pregunta 4b Fatiga Cronica	2.00	.97	1.61	1.09	2.89	1.15	1.1 9	1.39
Pregunta 4c Dolores de Cabeza o Migraña	2.11	1.08	1.94	1.16	3.00	1.24	1.4 1	1.55
Pregunta 4d Problemas de Digestion, Dolor abdominal o Diarrea	1.78	1.06	1.44	.92	3.19	1.21	.67	.73
Pregunta 4e Rascarse, Morderse, Frotarse	2.39	1.24	1.28	.89	3.52	1.37	.67	.73
Pregunta 4f Somnolencia o necesidad de Dormir	2.67	.91	2.11	1.18	3.33	1.00	1.2 2	1.40
Pregunta 4g Reacciones Psicologicas	2.17	1.20	1.56	.98	2.85	1.20	.78	.97
Pregunta 4h Inquietud (incapacidad Relajarse o Traquilo)	2.56	1.20	1.78	1.17	3.00	.88	.81	.92
Pregunta 4i Sentimientos Depresion y Tristeza	2.00	.97	1.61	1.09	2.52	.75	.85	1.06
Pregunta 4j Ansiedad, Angustia o Desesperacion	2.11	.90	1.33	.69	3.26	.94	.96	1.09

Pregunta 4l Problemas de Concentracion	2.67	1.08	2.50	1.47	3.33	.88	1.3 3	1.54
Pregunta 4m Sentimiento de Agresividad o Irratividad	2.11	1.23	2.17	1.20	2.56	1.01	1.3 0	1.46
Pregunta 4n Reacciones Comportamentales	2.17	1.20	1.89	1.32	2.52	1.25	1.1 1	1.34
Pregunta 4o Conflictos Polemizar o Discutir	1.83	.79	1.94	1.16	2.52	.98	1.2 6	1.43
Pregunta 4p Aislamiento	1.78	1.17	2.17	1.47	2.26	1.02	1.3 3	1.52
Pregunta 4q Desgano Labores Escolares	2.11	.90	2.50	1.38	2.44	.75	1.4 1	1.50
Pregunta 4r Aumento o Reduccion Alimentos	2.67	1.19	1.94	1.35	3.30	.91	1.3 0	1.35
Pregunta 5a Habilidad Asertiva	3.61	.70	3.17	1.38	3.85	.72	1.8 5	1.99
Pregunta 5b Elaboracion de Plan y Tareas	3.28	.75	2.72	1.36	3.37	.79	1.5 9	1.65
Pregunta 5c Elogios asi mismos	3.28	1.07	2.50	1.47	2.89	1.01	1.1 1	1.25
Pregunta 5d Religiosidad	2.22	1.06	2.00	1.33	2.56	1.19	1.3 3	1.47
Pregunta 5e Busqueda de Informacion sobre Situacion	2.61	1.09	2.56	1.38	3.56	.97	1.3 3	1.57
Pregunta 5f Ventilacion o Confidencias	2.61	1.04	2.67	1.19	3.30	1.20	1.3 7	1.50

Prueba T

Estadísticas de muestras emparejadas

		Media	N	Desviación estándar	Media de error estándar
Par 1	Total demandas del entorno	25.91	45	4.949	.738
	Total demandas del entorno	14.62	45	10.800	1.610

Correlaciones de muestras emparejadas

		N	Correlación	Sig.
Par 1	Total demandas del entorno & Total demandas del entorno	45	-.083	.587

Prueba de muestras emparejadas

		Diferencias emparejadas					t	gl	Sig. (bilateral)
		Media	Desviación estándar	Media de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia				
					Inferior	Superior			
Par 1	Total demandas del entorno - Total demandas del entorno	11.289	12.249	1.826	7.609	14.969	6.183	44	.000

DATASET ACTIVATE ConjuntoDatos2.

Prueba T

Estadísticas de muestras emparejadas

		Media	N	Desviación estándar	Media de error estándar
Par 1	Diarrea	.22	45	.420	.063
	Diarrea	.84	45	.367	.055

Correlaciones de muestras emparejadas

		N	Correlación	Sig.
Par 1	Diarrea & Diarrea	45	.082	.593

Prueba de muestras emparejadas

		Diferencias emparejadas				t	gl	Sig. (bilateral)	
		Media	Desviación estándar	Media de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia				
					Inferior				Superior
Par 1	Diarrea - Diarrea	-.622	.535	.080	-.783	-.462	-7.807	44	.000

```
T-TEST PAIRS=DRA_inicial FTA_inicial DTN_inicial NAU_inicial EST_inicial VOM_inicial ADP_inicial
PIR_inicial MRS_inicial HCN_inicial BOR_inicial WITH DRA_final FTA_final DTN_final NAU_final
EST_final VOM_final ADP_final PIR_final MRS_final HCN_final BOR_final (PAIRED)
/CRITERIA=CI(.9500)
/MATCH=ONLY WITH
```

Prueba de muestras emparejadas

		Diferencias emparejadas					t	gl	Sig. (bilateral)
		Media	Desviación estándar	Media de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia				
					Inferior	Superior			
Par 1	Diarrea - Diarrea	-.622	.535	.080	-.783	-.462	-7.807	44	.000
Par 2	Flatulencias - Flatulencias	-.222	.560	.083	-.390	-.054	-2.664	44	.011
Par 3	Distensión abdominal - Distensión muscular	-.467	.505	.075	-.618	-.315	-6.205	44	.000
Par 4	Náuseas - Náuseas	-.822	.387	.058	-.938	-.706	-14.265	44	.000
Par 5	Estreñimineto - Estreñimiento	-.578	.543	.081	-.741	-.415	-7.137	44	.000
Par 6	Vómito - Vómito	-.889	.318	.047	-.984	-.793	-18.762	44	.000
Par 7	Alteraciones del apetito - Alteraciones del apetito	-.333	.477	.071	-.477	-.190	-4.690	44	.000
Par 8	Pirosis - Pirosis	-.622	.490	.073	-.770	-.475	-8.513	44	.000
Par 9	Mareos - Mareos	-.622	.490	.073	-.770	-.475	-8.513	44	.000
Par 10	Hinchazón - Hinchazón	-.689	.468	.070	-.830	-.548	-9.871	44	.000
Par 11	Borborismo - Borborismo	-.511	.549	.082	-.676	-.346	-6.249	44	.000

Prueba T

Estadísticas de muestras emparejadas

		Media	N	Desviación estándar	Media de error estándar
Par 1	Diarrea	.22	45	.420	.063
	Diarrea	.84	45	.367	.055
Par 2	Flatulencias	.60	45	.495	.074
	Flatulencias	.82	45	.387	.058
Par 3	Distensión abdominal	.40	45	.495	.074
	Distensión muscular	.87	45	.344	.051
Par 4	Náuseas	.16	45	.367	.055
	Náuseas	.98	45	.149	.022
Par 5	Estreñimiento	.36	45	.484	.072
	Estreñimiento	.93	45	.252	.038
Par 6	Vómito	.09	45	.288	.043
	Vómito	.98	45	.149	.022
Par 7	Alteraciones del apetito	.51	45	.506	.075
	Alteraciones del apetito	.84	45	.367	.055
Par 8	Pirosis	.36	45	.484	.072
	Pirosis	.98	45	.149	.022
Par 9	Mareos	.36	45	.484	.072
	Mareos	.98	45	.149	.022
Par 10	Hinchazón	.18	45	.387	.058
	Hinchazón	.87	45	.344	.051
Par 11	Borborismo	.36	45	.484	.072
	Borborismo	.87	45	.344	.051

Puebla, Pue a 11 de diciembre del 2020

Dra. Beatriz Pérez Armendáriz
Coordinadora de los posgrados en Biotecnología

Directora del Programa de doctorado en Biotecnología

Asunto: Revisión de plagio para proyecto de grado

En atención a los requerimientos solicitados por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología para las actividades de aseguramiento de la calidad y consolidación del posgrado. Envío el resultado derivado del proceso de revisión de la herramienta de Antiplagio SafeAssign se detectaron los siguientes hallazgos:

Base datos Global: 15%

Internet: 6%

Archivo de documentos: 5%

Por lo anterior se vislumbra un riesgo menor en el análisis del documento para la obtención del grado del alumno Laura Márquez Morales.

Se anexa reporte del informe de la herramienta.

Atentamente



Director de Tesis
Beatriz Pérez Armendáriz

Originality Report de SafeAssign

Resumen del informe

11/12/2020

SafeAssign Originality Report



(<http://safeassign.blackboard.com/>)

SP_001 - PROYECTOS TESIS

Laura márquez

LAURA MARQUEZ MORALES

on Wed, Dec 09 2020, 9:09 PM

26% highest match

Submission ID: 44c7a82d-3275-483d-951d-528f52ec0db2

Attachments (1)

Tesis Laura Marquez Morales prueba2.docx ⓘ 26%

Recuento de palabras: 32,414

ID del adjunto: 3835845447

Tesis Laura Marquez Morales prueba2.docx

UPAEP
21 Sur 1103
Barrio de Santiago
Puebla, Pue. México
C.P. 72410

Tel: 01 (222) 229 9600
Fax: 01 (222) 232 5251
01 800 224 2300
www.upaep.mx

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Selye H. Stress in health and disease. Butterworth-Heinemann; 2013. 1301 p.1
- AlJaber, M. I., Alwehaibi, A. I., Algaed, H. A., Arafah, A. M., & Binsebayel, O. A. (2019). Effect of academic stressors on eating habits among medical students in Riyadh, Saudi Arabia. *Journal of Family Medicine and Primary Care*, 8(2), 390-400.
https://doi.org/10.4103/jfmpc.jfmpc_455_18
- Allaert, F. A., Courau, S., & Forestier, A. (2016). Effect of magnesium, probiotic, and vitamin food supplementation in healthy subjects with psychological stress and evaluation of a persistent effect after discontinuing intake. *Panminerva Medica*, 58(4), 263-270.
- Allen, A. P., Dinan, T. G., Clarke, G., & Cryan, J. F. (2017). A psychology of the human brain-gut-microbiome axis. *Social and Personality Psychology Compass*, 11(4), e12309. <https://doi.org/10.1111/spc3.12309>
- Altveş, S., Yildiz, H. K., & Vural, H. C. (2020). Interaction of the microbiota with the human body in health and diseases. *Bioscience of Microbiota, Food and Health*, 39(2), 23-32. <https://doi.org/10.12938/bmfh.19-023>
- Anzawa, D., Mawatari, T., Tanaka, Y., Yamamoto, M., Genda, T., Takahashi, S., Nishijima, T., Kamasaka, H., Suzuki, S., & Kuriki, T. (2019). Effects of synbiotics containing Bifidobacterium animalis subsp. lactis GCL2505 and inulin on intestinal bifidobacteria: A randomized, placebo-controlled, crossover study. *Food Science & Nutrition*, 7(5), 1828-1837.
<https://doi.org/10.1002/fsn3.1033>
- Arteaga-Chávez, F., López-Vera, M., Laurencio-Silva, M., Rondón-Castillo, A., Milián-Flrido, G., Barrios-González, V., & Bocourt-Salabarria, R. (2017). Selección e identificación de aislados de Bacillus spp. Del tracto digestivo de pollos de traspatio, con potencial probiótico. *Pastos y Forrajes*, 40(1), 55-64.
- Asemi, Z., Alizadeh, S.-A., Ahmad, K., Goli, M., & Esmaillzadeh, A. (2016). Effects of beta-carotene fortified synbiotic food on metabolic control of patients with type 2 diabetes mellitus: A double-blind randomized cross-over controlled clinical trial. *Clinical Nutrition (Edinburgh, Scotland)*, 35(4), 819-825. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2015.07.009>
- Bacchetti De Gregoris, T., Aldred, N., Clare, A. S., & Burgess, J. G. (2011). Improvement of phylum- and class-specific primers for real-time PCR quantification of bacterial taxa. *Journal of Microbiological Methods*, 86(3), 351-356.
<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2011.06.010>
- Bagga, D., Reichert, J. L., Koschutnig, K., Aigner, C. S., Holzer, P., Koskinen, K., Moissl-Eichinger, C., & Schöpf, V. (2018a). Probiotics drive gut microbiome triggering emotional brain signatures. *Gut Microbes*, 9(6), 486-496.
<https://doi.org/10.1080/19490976.2018.1460015>
- Bagga, D., Reichert, J. L., Koschutnig, K., Aigner, C. S., Holzer, P., Koskinen, K., Moissl-Eichinger, C., & Schöpf, V. (2018b). Probiotics drive gut microbiome triggering emotional brain signatures. *Gut Microbes*, 9(6), 486-496.
<https://doi.org/10.1080/19490976.2018.1460015>
- Bahmani, F., Tajadadi-Ebrahimi, M., Kolahdooz, F., Mazouchi, M., Hadaegh, H., Jamal, A.-S., Mazroii, N., Asemi, S., & Asemi, Z. (2016). The consumption of synbiotic bread containing lactobacillus sporogenes and inulin affects nitric oxide and malondialdehyde in patients with type 2 diabetes mellitus: Randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Journal of the American College of Nutrition*, 35(6), 506-513. <https://doi.org/10.1080/07315724.2015.1032443>

- Bailey, M. T., Dowd, S. E., Galley, J. D., Hufnagle, A. R., Allen, R. G., & Lyte, M. (2011a). Exposure to a social stressor alters the structure of the intestinal microbiota: Implications for stressor-induced immunomodulation. *Brain, Behavior, and Immunity*, 25(3), 397-407. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2010.10.023>
- Bailey, M. T., Dowd, S. E., Galley, J. D., Hufnagle, A. R., Allen, R. G., & Lyte, M. (2011b). Exposure to a social stressor alters the structure of the intestinal microbiota: Implications for stressor-induced immunomodulation. *Brain, Behavior, and Immunity*, 25(3), 397-407. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2010.10.023>
- Bakhshimoghaddam, F., Shateri, K., Sina, M., Hashemian, M., & Alizadeh, M. (2018). Daily consumption of synbiotic yogurt decreases liver steatosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease: A randomized controlled clinical trial. *The Journal of Nutrition*, 148(8), 1276-1284. <https://doi.org/10.1093/jn/nxy088>
- Barraza, A. (s. f.). El Inventario SISCO del Estrés Académico. *Investigación Educativa Duranguense*, 7(2007-039X), 90-93.
- Behera, S. S., Ray, R. C., & Zdolec, N. (2018). Lactobacillus plantarum with functional properties: An approach to increase safety and shelf-life of fermented foods. *BioMed Research International*, 2018, 9361614. <https://doi.org/10.1155/2018/9361614>
- Berer, K., Gerdes, L. A., Cekanaviciute, E., Jia, X., Xiao, L., Xia, Z., Liu, C., Klotz, L., Stauffer, U., Baranzini, S. E., Kumpfel, T., Hohlfeld, R., Krishnamoorthy, G., & Wekerle, H. (2017). Gut microbiota from multiple sclerosis patients enables spontaneous autoimmune encephalomyelitis in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(40), 10719-10724. <https://doi.org/10.1073/pnas.1711233114>
- Berger, M., Gray, J. A., & Roth, B. L. (2009). The expanded biology of serotonin. *Annual Review of Medicine*, 60, 355-366. <https://doi.org/10.1146/annurev.med.60.042307.110802>
- Bibbey, A., Phillips, A. C., Ginty, A. T., & Carroll, D. (2015). Problematic Internet use, excessive alcohol consumption, their comorbidity and cardiovascular and cortisol reactions to acute psychological stress in a student population. *Journal of Behavioral Addictions*, 4(2), 44-52. <https://doi.org/10.1556/2006.4.2015.006>
- Bogovič Matijašić, B., Obermajer, T., Lipoglavšek, L., Sernel, T., Locatelli, I., Kos, M., Šmid, A., & Rogelj, I. (2016). Effects of synbiotic fermented milk containing Lactobacillus acidophilus La-5 and Bifidobacterium animalis ssp. lactis BB-12 on the fecal microbiota of adults with irritable bowel syndrome: A randomized double-blind, placebo-controlled trial. *Journal of Dairy Science*, 99(7), 5008-5021. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10743>
- Bonaz, B., Bazin, T., & Pellissier, S. (2018a). The vagus nerve at the interface of the microbiota-gut-brain axis. *Frontiers in Neuroscience*, 12, 49. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00049>
- Bonaz, B., Bazin, T., & Pellissier, S. (2018b). The vagus nerve at the interface of the microbiota-gut-brain axis. *Frontiers in Neuroscience*, 12, 49. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00049>
- Castillo, A. G., Saez, K., Perez, C., & Castillo Navarrete, J. L. (2018). Validity and reliability of SISCO inventory of academic stress among health students in Chile. *JPMA. The Journal of the Pakistan Medical Association*, 68(12), 1759-1762.
- Chandel, D. S., Perez-Munoz, M. E., Yu, F., Boissy, R., Satpathy, R., Misra, P. R., Sharma, N., Chaudhry, R., Parida, S., Peterson, D. A., Gewolb, I. H., & Panigrahi, P. (2017a). Changes in the gut microbiota after early administration of oral synbiotics to young infants in india. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 65(2), 218-224. <https://doi.org/10.1097/MPG.0000000000001522>

- Chandel, D. S., Perez-Munoz, M. E., Yu, F., Boissy, R., Satpathy, R., Misra, P. R., Sharma, N., Chaudhry, R., Parida, S., Peterson, D. A., Gewolb, I. H., & Panigrahi, P. (2017b). Changes in the gut microbiota after early administration of oral synbiotics to young infants in India. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 65(2), 218-224.
<https://doi.org/10.1097/MPG.0000000000001522>
- Chang, Y.-M., El-Zaatari, M., & Kao, J. Y. (2014). Does stress induce bowel dysfunction? *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology*, 8(6), 583-585. <https://doi.org/10.1586/17474124.2014.911659>
- Choi, B.-R., Kwon, E.-Y., Kim, H.-J., & Choi, M.-S. (2018). Role of synbiotics containing d-allulose in the alteration of body fat and hepatic lipids in diet-induced obese mice. *Nutrients*, 10(11). <https://doi.org/10.3390/nu10111797>
- Chong, H. X., Yusoff, N. A. A., Hor, Y.-Y., Lew, L.-C., Jaafar, M. H., Choi, S.-B., Yusoff, M. S. B., Wahid, N., Abdullah, M. F. I. L., Zakaria, N., Ong, K.-L., Park, Y.-H., & Liong, M.-T. (2019). Lactobacillus plantarum DR7 alleviates stress and anxiety in adults: A randomised, double-blind, placebo-controlled study. *Beneficial Microbes*, 10(4), 355-373.
<https://doi.org/10.3920/BM2018.0135>
- Chung, S., Son, G. H., & Kim, K. (2011). Circadian rhythm of adrenal glucocorticoid: Its regulation and clinical implications. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1812(5), 581-591. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2011.02.003>
- Clarke, G., Cryan, J. F., Dinan, T. G., & Quigley, E. M. (2012). Review article: Probiotics for the treatment of irritable bowel syndrome--focus on lactic acid bacteria. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 35(4), 403-413. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2011.04965.x>
- Clarke, Gerard, Stilling, R. M., Kennedy, P. J., Stanton, C., Cryan, J. F., & Dinan, T. G. (2014). Minireview: Gut microbiota: the neglected endocrine organ. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 28(8), 1221-1238. <https://doi.org/10.1210/me.2014-1108>
- Cohen, S., Gianaros, P. J., & Manuck, S. B. (2016). A stage model of stress and disease. *Perspectives on Psychological Science: A Journal of the Association for Psychological Science*, 11(4), 456-463. <https://doi.org/10.1177/1745691616646305>
- Cox, A. J., Makino, H., Cripps, A. W., & West, N. P. (2019). Recovery of Lactobacillus casei strain Shirota (Lcs) from faeces with 14 days of fermented milk supplementation in healthy Australian adults. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 28(4), 734-739. [https://doi.org/10.6133/apjcn.201912_28\(4\).0009](https://doi.org/10.6133/apjcn.201912_28(4).0009)
- Cryan, J. F., & Dinan, T. G. (2012). Mind-altering microorganisms: The impact of the gut microbiota on brain and behaviour. *Nature Reviews. Neuroscience*, 13(10), 701-712. <https://doi.org/10.1038/nrn3346>
- Culpepper, T., Christman, M. C., Nieves, C., Specht, G. J., Rowe, C. C., Spaiser, S. J., Ford, A. L., Dahl, W. J., Girard, S. A., & Langkamp-Henken, B. (2016). Bifidobacterium bifidum R0071 decreases stress-associated diarrhoea-related symptoms and self-reported stress: A secondary analysis of a randomised trial. *Beneficial Microbes*, 7(3), 327-336.
<https://doi.org/10.3920/BM2015.0156>
- de La Rosa-Rojas, G., Chang-Grozo, S., Delgado-Flores, L., Oliveros-Lijap, L., Murillo-Pérez, D., Ortiz-Lozada, R., Vela-Ulloa, G., & Yhuri Carreazo, N. (2015). [Level of stress and coping strategy in medical students compared with students of other careers]. *Gaceta Medica De Mexico*, 151(4), 443-449.
- De Palma, G., Collins, S. M., Bercik, P., & Verdu, E. F. (2014). The microbiota-gut-brain axis in gastrointestinal disorders: Stressed bugs,

- stressed brain or both? *The Journal of Physiology*, 592(14), 2989-2997. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2014.273995>
- Debré, P. (2016). [The microbiota's challenges]. *Medecine Sciences: M/S*, 32(11), 919-920. <https://doi.org/10.1051/medsci/20163211001>
- Derrien, M., & Vlieg, J. E. T. van H. (2015). Fate, activity, and impact of ingested bacteria within the human gut microbiota. *Trends in Microbiology*, 23(6), 354-366. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2015.03.002>
- Desbonnet, L., Clarke, G., Shanahan, F., Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2014). Microbiota is essential for social development in the mouse. *Molecular Psychiatry*, 19(2), 146-148. <https://doi.org/10.1038/mp.2013.65>
- Dyrbye, L. N., Schwartz, A., Downing, S. M., Szydlo, D. W., Sloan, J. A., & Shanafelt, T. D. (2011). Efficacy of a brief screening tool to identify medical students in distress. *Academic Medicine: Journal of the Association of American Medical Colleges*, 86(7), 907-914. <https://doi.org/10.1097/ACM.0b013e31821da615>
- El Hangouche, A. J., Jniene, A., Aboudrar, S., Errguig, L., Rkain, H., Cherti, M., & Dakka, T. (2018). Relationship between poor quality sleep, excessive daytime sleepiness and low academic performance in medical students. *Advances in Medical Education and Practice*, 9, 631-638. <https://doi.org/10.2147/AMEP.S162350>
- Enani, S., Przemska-Kosicka, A., Childs, C. E., Maidens, C., Dong, H., Conterno, L., Tuohy, K., Todd, S., Gosney, M., & Yaqoob, P. (2018). Impact of ageing and a synbiotic on the immune response to seasonal influenza vaccination; a randomised controlled trial. *Clinical Nutrition (Edinburgh, Scotland)*, 37(2), 443-451. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2017.01.011>
- Encuesta Nacional de Salud y Nutrición. (2016). ENSANUT. <https://ensanut.insp.mx/index.php>
- Ered, A., Cooper, S., & Ellman, L. M. (2018). Sleep quality, psychological symptoms, and psychotic-like experiences. *Journal of Psychiatric Research*, 98, 95-98. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2017.12.016>
- Escalante, A., Giles-Gómez, M., Hernández, G., Córdova-Aguilar, M. S., López-Munguía, A., Gosset, G., & Bolívar, F. (2008a). Analysis of bacterial community during the fermentation of pulque, a traditional Mexican alcoholic beverage, using a polyphasic approach. *International Journal of Food Microbiology*, 124(2), 126-134. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.03.003>
- Escalante, A., Giles-Gómez, M., Hernández, G., Córdova-Aguilar, M. S., López-Munguía, A., Gosset, G., & Bolívar, F. (2008b). Analysis of bacterial community during the fermentation of pulque, a traditional Mexican alcoholic beverage, using a polyphasic approach. *International Journal of Food Microbiology*, 124(2), 126-134. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.03.003>
- Escalante, A., López Soto, D. R., Velázquez Gutiérrez, J. E., Giles-Gómez, M., Bolívar, F., & López-Munguía, A. (2016). Pulque, a traditional mexican alcoholic fermented beverage: Historical, microbiological, and technical aspects. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1026. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01026>
- Escalante, A., Rodríguez, M. E., Martínez, A., López-Munguía, A., Bolívar, F., & Gosset, G. (2004). Characterization of bacterial diversity in pulque, a traditional Mexican alcoholic fermented beverage, as determined by 16S rDNA analysis. *FEMS Microbiology Letters*, 235(2), 273-279. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.04.045>
- Foster, J. A., Rinaman, L., & Cryan, J. F. (2017). Stress & the gut-brain axis: Regulation by the microbiome. *Neurobiology of Stress*, 7, 124-136. <https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2017.03.001>
- Freestone, P. P., Williams, P. H., Haigh, R. D., Maggs, A. F., Neal, C. P., & Lyte, M. (2002). Growth stimulation of intestinal commensal *Escherichia coli* by catecholamines: A possible contributory factor in trauma-induced sepsis. *Shock (Augusta, Ga.)*, 18(5), 465-470. <https://doi.org/10.1097/00024382-200211000-00014>

- Fujita, Y., & Maki, K. (2018). Associations of smoking behavior with lifestyle and mental health among Japanese dental students. *BMC Medical Education*, 18(1), 264. <https://doi.org/10.1186/s12909-018-1365-1>
- Gao, X., Cao, Q., Cheng, Y., Zhao, D., Wang, Z., Yang, H., Wu, Q., You, L., Wang, Y., Lin, Y., Li, X., Wang, Y., Bian, J.-S., Sun, D., Kong, L., Birnbaumer, L., & Yang, Y. (2018). Chronic stress promotes colitis by disturbing the gut microbiota and triggering immune system response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(13), E2960-E2969. <https://doi.org/10.1073/pnas.1720696115>
- Garbeva, P., van Veen, J. A., & van Elsas, J. D. (2003). Predominant *Bacillus* spp. In agricultural soil under different management regimes detected via PCR-DGGE. *Microbial Ecology*, 45(3), 302-316. <https://doi.org/10.1007/s00248-002-2034-8>
- Ge, X., Zhao, W., Ding, C., Tian, H., Xu, L., Wang, H., Ni, L., Jiang, J., Gong, J., Zhu, W., Zhu, M., & Li, N. (2017). Potential role of fecal microbiota from patients with slow transit constipation in the regulation of gastrointestinal motility. *Scientific Reports*, 7(1), 441. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00612-y>
- George Kerry, R., Patra, J. K., Gouda, S., Park, Y., Shin, H.-S., & Das, G. (2018). Benefaction of probiotics for human health: A review. *Journal of Food and Drug Analysis*, 26(3), 927-939. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2018.01.002>
- Giri, S. S., Sukumaran, V., Sen, S. S., & Park, S. C. (2018). Use of a potential probiotic, *Lactobacillus casei* l4, in the preparation of fermented coconut water beverage. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1976. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01976>
- Glenk, L. M., Kothgassner, O. D., Felnhöfer, A., Gotovina, J., Pranger, C. L., Jensen, A. N., Mothes-Luksch, N., Goreis, A., Palme, R., & Jensen-Jarolim, E. (2020). Salivary cortisol responses to acute stress vary between allergic and healthy individuals: The role of plasma oxytocin, emotion regulation strategies, reported stress and anxiety. *Stress (Amsterdam, Netherlands)*, 23(3), 275-283. <https://doi.org/10.1080/10253890.2019.1675629>
- Google search | food and agriculture organization of the united nations. (s. f.). Recuperado 30 de octubre de 2020, de <http://www.fao.org/home/search/en/?q=probiotics>
- Grochowska, M., Wojnar, M., & Radkowski, M. (2018). The gut microbiota in neuropsychiatric disorders. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, 78(2), 69-81.
- Guo, X., Xia, X., Tang, R., Zhou, J., Zhao, H., & Wang, K. (2008). Development of a real-time PCR method for Firmicutes and Bacteroidetes in faeces and its application to quantify intestinal population of obese and lean pigs. *Letters in Applied Microbiology*, 47(5), 367-373. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2008.02408.x>
- Gupta, S., Choudhury, S., Das, M., Mondol, A., & Pradhan, R. (2015). Factors causing stress among students of a medical college in Kolkata, India. *Education for Health (Abingdon, England)*, 28(1), 92-95. <https://doi.org/10.4103/1357-6283.161924>
- Guzmán-Pedraza, R., & Contreras-Esquivel, J. C. (2018). Aguamiel y su fermentación: Ciencia más allá de la tradición. *Mexican Journal of Biotechnology*, 3(1), 1-22. <https://doi.org/10.29267/mxjb.2018.3.1.1>
- Hadi, A., Sepandi, M., Marx, W., Moradi, S., & Parastouei, K. (2019). Clinical and psychological responses to synbiotic supplementation in obese or overweight adults: A randomized clinical trial. *Complementary Therapies in Medicine*, 47, 102216. <https://doi.org/10.1016/j.ctim.2019.102216>
- Hamaslim, H. J. (2016). Synbiotic as feed additives relating to animal health and performance. *Advances in Microbiology*, 06(04), 288-302. <https://doi.org/10.4236/aim.2016.64028>

- Hosseinkhani, Z., Nedjat, S., Hassanabadi, H. R., & Parsaeian, M. (2019). Academic stress from the viewpoint of Iranian adolescents: A qualitative study. *Journal of Education and Health Promotion*, 8, 13. https://doi.org/10.4103/jehp.jehp_202_18
- Hyland, N. P., & Cryan, J. F. (2010). A gut feeling about gaba: Focus on gaba(B) receptors. *Frontiers in Pharmacology*, 1, 124. <https://doi.org/10.3389/fphar.2010.00124>
- Islam, S. U. (2016). Clinical uses of probiotics. *Medicine*, 95(5), e2658. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000002658>
- Jennings, J., Antrobus, Kathleen L., Atencio, Sam J., Glavich, E., Johnson, R., Loffler, G., & Luu, C. (2005). "Drinking beer in a blissful mood": Alcohol production, operational chains, and feasting in the ancient world. *Current Anthropology*, 46(2), 275-303. <https://doi.org/10.1086/427119>
- Jiang, H., Ling, Z., Zhang, Y., Mao, H., Ma, Z., Yin, Y., Wang, W., Tang, W., Tan, Z., Shi, J., Li, L., & Ruan, B. (2015). Altered fecal microbiota composition in patients with major depressive disorder. *Brain, Behavior, and Immunity*, 48, 186-194. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2015.03.016>
- Kabito, G. G., Wami, S. D., Chercos, D. H., & Mekonnen, T. H. (2020). Work-related stress and associated factors among academic staffs at the university of gondar, northwest ethiopia: An institution-based cross-sectional study. *Ethiopian Journal of Health Sciences*, 30(2), 223-232. <https://doi.org/10.4314/ejhs.v30i2.10>
- Karamali, M., Nasiri, N., Taghavi Shavazi, N., Jamilian, M., Bahmani, F., Tajabadi-Ebrahimi, M., & Asemi, Z. (2018). The effects of synbiotic supplementation on pregnancy outcomes in gestational diabetes. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 10(3), 496-503. <https://doi.org/10.1007/s12602-017-9313-7>
- Karl, J. P., Hatch, A. M., Arcidiacono, S. M., Pearce, S. C., Pantoja-Feliciano, I. G., Doherty, L. A., & Soares, J. W. (2018). Effects of psychological, environmental and physical stressors on the gut microbiota. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2013. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02013>
- Karl, J. P., Margolis, L. M., Madslie, E. H., Murphy, N. E., Castellani, J. W., Gundersen, Y., Hoke, A. V., Levangie, M. W., Kumar, R., Chakraborty, N., Gautam, A., Hammamieh, R., Martini, S., Montain, S. J., & Pasiakos, S. M. (2017). Changes in intestinal microbiota composition and metabolism coincide with increased intestinal permeability in young adults under prolonged physiological stress. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 312(6), G559-G571. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00066.2017>
- Kato-Kataoka, A., Nishida, K., Takada, M., Suda, K., Kawai, M., Shimizu, K., Kushiro, A., Hoshi, R., Watanabe, O., Igarashi, T., Miyazaki, K., Kuwano, Y., & Rokutan, K. (2016). Fermented milk containing Lactobacillus casei strain Shirota prevents the onset of physical symptoms in medical students under academic examination stress. *Beneficial Microbes*, 7(2), 153-156. <https://doi.org/10.3920/BM2015.0100>
- Kato-Kataoka, Akito, Nishida, K., Takada, M., Kawai, M., Kikuchi-Hayakawa, H., Suda, K., Ishikawa, H., Gondo, Y., Shimizu, K., Matsuki, T., Kushiro, A., Hoshi, R., Watanabe, O., Igarashi, T., Miyazaki, K., Kuwano, Y., & Rokutan, K. (2016a). Fermented milk containing lactobacillus casei strain shirota preserves the diversity of the gut microbiota and relieves abdominal dysfunction in healthy medical students exposed to academic stress. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(12), 3649-3658. <https://doi.org/10.1128/AEM.04134-15>
- Kato-Kataoka, Akito, Nishida, K., Takada, M., Kawai, M., Kikuchi-Hayakawa, H., Suda, K., Ishikawa, H., Gondo, Y., Shimizu, K.,

- Matsuki, T., Kushiro, A., Hoshi, R., Watanabe, O., Igarashi, T., Miyazaki, K., Kuwano, Y., & Rokutan, K. (2016b). Fermented milk containing lactobacillus casei strain shirota preserves the diversity of the gut microbiota and relieves abdominal dysfunction in healthy medical students exposed to academic stress. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(12), 3649-3658. <https://doi.org/10.1128/AEM.04134-15>
- Kato-Kataoka, Akito, Nishida, K., Takada, M., Kawai, M., Kikuchi-Hayakawa, H., Suda, K., Ishikawa, H., Gondo, Y., Shimizu, K., Matsuki, T., Kushiro, A., Hoshi, R., Watanabe, O., Igarashi, T., Miyazaki, K., Kuwano, Y., & Rokutan, K. (2016c). Fermented milk containing lactobacillus casei strain shirota preserves the diversity of the gut microbiota and relieves abdominal dysfunction in healthy medical students exposed to academic stress. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(12), 3649-3658. <https://doi.org/10.1128/AEM.04134-15>
- Kelly, J. R., Keane, V. O., Cryan, J. F., Clarke, G., & Dinan, T. G. (2019). Mood and microbes: Gut to brain communication in depression. *Gastroenterology Clinics of North America*, 48(3), 389-405. <https://doi.org/10.1016/j.gtc.2019.04.006>
- Kim, Y.-K., & Shin, C. (2018). The microbiota-gut-brain axis in neuropsychiatric disorders: Pathophysiological mechanisms and novel treatments. *Current Neuropsychology*, 16(5), 559-573. <https://doi.org/10.2174/1570159X15666170915141036>
- Kleniewska, P., & Pawliczak, R. (2017). Influence of synbiotics on selected oxidative stress parameters. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, 9315375. <https://doi.org/10.1155/2017/9315375>
- Kleniewska, P., & Pawliczak, R. (2018). Assessment of human 4-hydroxynonenal, 8-isoprostane concentrations and glutathione reductase activity after synbiotics administration. *Advances in Medical Sciences*, 63(2), 301-305. <https://doi.org/10.1016/j.advms.2018.04.003>
- Knowles, S. R., Nelson, E. A., & Palombo, E. A. (2008). Investigating the role of perceived stress on bacterial flora activity and salivary cortisol secretion: A possible mechanism underlying susceptibility to illness. *Biological Psychology*, 77(2), 132-137. <https://doi.org/10.1016/j.biopsycho.2007.09.010>
- Koliada, A., Syzenko, G., Moseiko, V., Budovska, L., Puchkov, K., Perederiy, V., Gavalko, Y., Dorofeyev, A., Romanenko, M., Tkach, S., Sineok, L., Lushchak, O., & Vaiserman, A. (2017). Association between body mass index and Firmicutes/Bacteroidetes ratio in an adult Ukrainian population. *BMC Microbiology*, 17(1), 120. <https://doi.org/10.1186/s12866-017-1027-1>
- Konturek, P. C., Brzozowski, T., & Konturek, S. J. (2011). Stress and the gut: Pathophysiology, clinical consequences, diagnostic approach and treatment options. *Journal of Physiology and Pharmacology: An Official Journal of the Polish Physiological Society*, 62(6), 591-599.
- Korecka, A., & Arulampalam, V. (2012). The gut microbiome: Scourge, sentinel or spectator? *Journal of Oral Microbiology*, 4. <https://doi.org/10.3402/jom.v4i0.9367>
- Kruk, J., Aboul-Enein, B. H., Bernstein, J., & Gronostaj, M. (2019). Psychological stress and cellular aging in cancer: A meta-analysis. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019, 1270397. <https://doi.org/10.1155/2019/1270397>
- Krumbeck, J. A., Rasmussen, H. E., Hutkins, R. W., Clarke, J., Shawron, K., Keshavarzian, A., & Walter, J. (2018). Probiotic Bifidobacterium strains and galactooligosaccharides improve intestinal barrier function in obese adults but show no synergism when used together as synbiotics. *Microbiome*, 6(1), 121. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0494-4>
- Landgraf, D., McCarthy, M. J., & Welsh, D. K. (2014). Circadian clock and stress interactions in the molecular biology of psychiatric

- disorders. *Current Psychiatry Reports*, 16(10), 483. <https://doi.org/10.1007/s11920-014-0483-7>
- Lazarevich, I., Irigoyen Camacho, M. E., Velázquez-Alva, M. C., Flores, N. L., Nájera Medina, O., & Zepeda Zepeda, M. A. (2018). Depression and food consumption in Mexican college students. *Nutricion Hospitalaria*, 35(3), 620-626. <https://doi.org/10.20960/nh.1500>
- Legarraga, P., Moraga, M., Lam, M., Geoffroy, E., Zumarán, C., & García, P. (2013). Impacto de la espectrometría de masas por MALDI-TOF MS en la identificación rápida de bacterias aeróbicas y anaeróbicas de importancia clínica. *Revista chilena de infectología*, 30(2), 140-146. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182013000200004>
- Liang, S., Wang, T., Hu, X., Luo, J., Li, W., Wu, X., Duan, Y., & Jin, F. (2015). Administration of *Lactobacillus helveticus* NS8 improves behavioral, cognitive, and biochemical aberrations caused by chronic restraint stress. *Neuroscience*, 310, 561-577. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.09.033>
- Lieberman, H. R., Thompson, L. A., Caruso, C. M., Niro, P. J., Mahoney, C. R., McClung, J. P., & Caron, G. R. (2015). The catecholamine neurotransmitter precursor tyrosine increases anger during exposure to severe psychological stress. *Psychopharmacology*, 232(5), 943-951. <https://doi.org/10.1007/s00213-014-3727-7>
- Lim, Y. J., Jamaluddin, R., Hazizi, A. S., & Chieng, J. Y. (2018). Effects of synbiotics among constipated adults in serdang, selangor, malaysia-a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Nutrients*, 10(7). <https://doi.org/10.3390/nu10070824>
- Macías, A. B., García, L. A. G., Madero, A. G., & León, F. C. de. (2019). El estrés académico en alumnos de odontología. *Revista Mexicana de Estomatología*, 6(1), 12-26.
- Maidana, P., Bruno, O. D., & Mesch, V. (2013). [A critical analysis of cortisol measurements: An update]. *Medicina*, 73(6), 579-584.
- Mangiola, F., Ianiro, G., Franceschi, F., Fagioli, S., Gasbarrini, G., & Gasbarrini, A. (2016). Gut microbiota in autism and mood disorders. *World Journal of Gastroenterology*, 22(1), 361-368. <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i1.361>
- Maydych, V., Claus, M., Dychus, N., Ebel, M., Damaschke, J., Diestel, S., Wolf, O. T., Kleinsorge, T., & Watzl, C. (2017). Impact of chronic and acute academic stress on lymphocyte subsets and monocyte function. *PloS One*, 12(11), e0188108. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188108>
- Melin, J., Hartung, N., Parra-Guillen, Z. P., Whitaker, M. J., Ross, R. J., & Kloft, C. (2019). The circadian rhythm of corticosteroid-binding globulin has little impact on cortisol exposure after hydrocortisone dosing. *Clinical Endocrinology*, 91(1), 33-40. <https://doi.org/10.1111/cen.13969>
- Montiel-Castro, A. J., González-Cervantes, R. M., Bravo-Ruiseco, G., & Pacheco-López, G. (2013). The microbiota-gut-brain axis: Neurobehavioral correlates, health and sociality. *Frontiers in Integrative Neuroscience*, 7, 70. <https://doi.org/10.3389/fnint.2013.00070>
- Mora-López, J. L., Reyes-Agüero, J. A., Flores-Flores, J. L., Peña-Valdivia, C. B., & Aguirre-Rivera, J. R. (2011). Variación morfológica y humanización de la sección *Salmianae* del género *Agave*. *Agrociencia*, 45(4), 465-477.
- Moussaoui, N., Jacobs, J. P., Larauche, M., Biraud, M., Million, M., Mayer, E., & Taché, Y. (2017). Chronic early-life stress in rat pups alters basal corticosterone, intestinal permeability, and fecal microbiota at weaning: Influence of sex. *Journal of Neurogastroenterology and Motility*, 23(1), 135-143. <https://doi.org/10.5056/jnm16105>
- Nagaraja, A. S., Sadaoui, N. C., Dorniak, P. L., Lutgendorf, S. K., & Sood, A. K. (2016). Snapshot: Stress and disease. *Cell Metabolism*,

- 23(2), 388-388.e1. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.01.015>
- Nakanishi, J., Suematsu, Y., Arimura, T., Kuwano, T., Shiga, Y., Kitajima, K., Morito, N., Nii, T., Saku, K., & Miura, S.-I. (2018a). Recommendations of lifestyle modification according to a survey of first-year university students. *Journal of Clinical Medicine Research*, 10(10), 772-780. <https://doi.org/10.14740/jocmr3574w>
- Nakanishi, J., Suematsu, Y., Arimura, T., Kuwano, T., Shiga, Y., Kitajima, K., Morito, N., Nii, T., Saku, K., & Miura, S.-I. (2018b). Recommendations of lifestyle modification according to a survey of first-year university students. *Journal of Clinical Medicine Research*, 10(10), 772-780. <https://doi.org/10.14740/jocmr3574w>
- Nasri, K., Jamilian, M., Rahmani, E., Bahmani, F., Tajabadi-Ebrahimi, M., & Asemi, Z. (2018). The effects of synbiotic supplementation on hormonal status, biomarkers of inflammation and oxidative stress in subjects with polycystic ovary syndrome: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *BMC Endocrine Disorders*, 18(1), 21. <https://doi.org/10.1186/s12902-018-0248-0>
- Nishida, K., Sawada, D., Kawai, T., Kuwano, Y., Fujiwara, S., & Rokutan, K. (2017a). Para-psychobiotic *Lactobacillus gasseri* CP2305 ameliorates stress-related symptoms and sleep quality. *Journal of Applied Microbiology*, 123(6), 1561-1570. <https://doi.org/10.1111/jam.13594>
- Nishida, K., Sawada, D., Kawai, T., Kuwano, Y., Fujiwara, S., & Rokutan, K. (2017b). Para-psychobiotic *Lactobacillus gasseri* CP2305 ameliorates stress-related symptoms and sleep quality. *Journal of Applied Microbiology*, 123(6), 1561-1570. <https://doi.org/10.1111/jam.13594>
- Nishida, Kensei, Sawada, D., Kuwano, Y., Tanaka, H., & Rokutan, K. (2019a). Health benefits of *Lactobacillus gasseri* cp2305 tablets in young adults exposed to chronic stress: A randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Nutrients*, 11(8). <https://doi.org/10.3390/nu11081859>
- Nishida, Kensei, Sawada, D., Kuwano, Y., Tanaka, H., & Rokutan, K. (2019b). Health benefits of *Lactobacillus gasseri* cp2305 tablets in young adults exposed to chronic stress: A randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Nutrients*, 11(8). <https://doi.org/10.3390/nu11081859>
- Oligschlaeger, Y., Yadati, T., Houben, T., Condello Oliván, C. M., & Shiri-Sverdlov, R. (2019). Inflammatory bowel disease: A stressed «gut/feeling». *Cells*, 8(7). <https://doi.org/10.3390/cells8070659>
- Olveira, G., & González-Molero, I. (2016). An update on probiotics, prebiotics and symbiotics in clinical nutrition. *Endocrinología Y Nutrición: Organo De La Sociedad Espanola De Endocrinología Y Nutrición*, 63(9), 482-494. <https://doi.org/10.1016/j.endonu.2016.07.006>
- Ortiz-Basurto, R. I., Pourcelly, G., Doco, T., Williams, P., Dornier, M., & Belleville, M.-P. (2008). Analysis of the main components of the aguamiel produced by the maguey-pulquero (*Agave mapisaga*) throughout the harvest period. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(10), 3682-3687. <https://doi.org/10.1021/jf072767h>
- Pacholko, A. G., Wotton, C. A., & Bekar, L. K. (2019). Poor diet, stress, and inactivity converge to form a «perfect storm» that drives alzheimer's disease pathogenesis. *Neuro-Degenerative Diseases*, 19(2), 60-77. <https://doi.org/10.1159/000503451>
- Papalini, S., Michels, F., Kohn, N., Wegman, J., van Hemert, S., Roelofs, K., Arias-Vasquez, A., & Aarts, E. (2019). Stress matters: Randomized controlled trial on the effect of probiotics on neurocognition. *Neurobiology of Stress*, 10, 100141.

- <https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2018.100141>
- Passos, M. do C. F., & Moraes-Filho, J. P. (2017). Intestinal microbiota in digestive diseases. *Arquivos De Gastroenterologia*, 54(3), 255-262. <https://doi.org/10.1590/S0004-2803.201700000-31>
- Patel, R. M., & Denning, P. W. (2013). Therapeutic use of prebiotics, probiotics, and postbiotics to prevent necrotizing enterocolitis: What is the current evidence? *Clinics in perinatology*, 40(1), 11-25. <https://doi.org/10.1016/j.clp.2012.12.002>
- Peter, J., Fournier, C., Durdevic, M., Knoblich, L., Keip, B., Dejaco, C., Trauner, M., & Moser, G. (2018). A microbial signature of psychological distress in irritable bowel syndrome. *Psychosomatic Medicine*, 80(8), 698-709. <https://doi.org/10.1097/PSY.0000000000000630>
- Pidgeon, A. M., McGrath, S., Magya, H. B., Stapleton, P., & Lo, B. C. Y. (2014). Psychosocial moderators of perceived stress, anxiety and depression in university students: An international study. *Open Journal of Social Sciences*, 2(11), 23-31. <https://doi.org/10.4236/jss.2014.211004>
- Portincasa, P., Bonfrate, L., de Bari, O., Lembo, A., & Ballou, S. (2017). Irritable bowel syndrome and diet. *Gastroenterology Report*, 5(1), 11-19. <https://doi.org/10.1093/gastro/gow047>
- Pozos-Radillo, E., Preciado-Serrano, L., Plascencia-Campos, A., Morales-Fernández, A., & Valdez-López, R. (2018). Predictive study of academic stress with the irritable bowel syndrome in medicine students at a public university in Mexico. *The Libyan Journal of Medicine*, 13(1), 1479599. <https://doi.org/10.1080/19932820.2018.1479599>
- Pozos-Radillo, E., Preciado-Serrano, L., Plascencia-Campos, A., Valdez-López, R., & Morales-Fernández, A. (2016). Psychophysiological manifestations associated with stress in students of a public university in Mexico: Psychophysiological manifestations associated with stress in students of a public university in Mexico. *Journal of Child and Adolescent Psychiatric Nursing*, 29(2), 79-84. <https://doi.org/10.1111/jcap.12142>
- Przemska-Kosicka, A., Childs, C. E., Maidens, C., Dong, H., Todd, S., Gosney, M. A., Tuohy, K. M., & Yaqoob, P. (2018). Age-related changes in the natural killer cell response to seasonal influenza vaccination are not influenced by a synbiotic: A randomised controlled trial. *Frontiers in Immunology*, 9, 591. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00591>
- Ramírez, L. A., Pérez-Padilla, E. A., García-Oscos, F., Salgado, H., Atzori, M., & Pineda, J. C. (2018). A new theory of depression based on the serotonin/kynurenine relationship and the hypothalamicpituitary- adrenal axis. *Biomedica: Revista Del Instituto Nacional De Salud*, 38(3), 437-450. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v38i3.3688>
- Rea, K., Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2016). The microbiome: A key regulator of stress and neuroinflammation. *Neurobiology of Stress*, 4, 23-33. <https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2016.03.001>
- Rekha, R., Alam Rizvi, M., & Jaishree, P. (2006). Designing and validation of genus-specific primers for human gut flora study. *Electronic Journal of Biotechnology*, 9(5), 0-0.
- Rentala, S., Nayak, R. B., Patil, S. D., Hegde, G. S., & Aladakatti, R. (2019). Academic stress among Indian adolescent girls. *Journal of Education and Health Promotion*, 8, 158. https://doi.org/10.4103/jehp.jehp_116_19
- Rogha, M., Esfahani, M. Z., & Zargazadeh, A. H. (2014). The efficacy of a synbiotic containing Bacillus Coagulans in treatment of irritable bowel syndrome: A randomized placebo-controlled trial. *Gastroenterology and Hepatology from Bed to Bench*, 7(3), 156-163.

- Rossi, M., Johnson, D. W., Morrison, M., Pascoe, E. M., Coombes, J. S., Forbes, J. M., Szeto, C.-C., McWhinney, B. C., Ungerer, J. P. J., & Campbell, K. L. (2016). Synbiotics easing renal failure by improving gut microbiology (Synergy): A randomized trial. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology: CJASN*, 11(2), 223-231. <https://doi.org/10.2215/CJN.05240515>
- Rudzki, L., Ostrowska, L., Pawlak, D., Matus, A., Pawlak, K., Waszkiewicz, N., & Szulc, A. (2019). Probiotic *Lactobacillus Plantarum* 299v decreases kynurenine concentration and improves cognitive functions in patients with major depression: A double-blind, randomized, placebo controlled study. *Psychoneuroendocrinology*, 100, 213-222. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2018.10.010>
- Sampson, T. R., Debelius, J. W., Thron, T., Janssen, S., Shastri, G. G., Ilhan, Z. E., Challis, C., Schretter, C. E., Rocha, S., Gradinaru, V., Chesselet, M.-F., Keshavarzian, A., Shannon, K. M., Krajmalnik-Brown, R., Wittung-Stafshede, P., Knight, R., & Mazmanian, S. K. (2016a). Gut microbiota regulate motor deficits and neuroinflammation in a model of parkinson's disease. *Cell*, 167(6), 1469-1480.e12. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.11.018>
- Sampson, T. R., Debelius, J. W., Thron, T., Janssen, S., Shastri, G. G., Ilhan, Z. E., Challis, C., Schretter, C. E., Rocha, S., Gradinaru, V., Chesselet, M.-F., Keshavarzian, A., Shannon, K. M., Krajmalnik-Brown, R., Wittung-Stafshede, P., Knight, R., & Mazmanian, S. K. (2016b). Gut microbiota regulate motor deficits and neuroinflammation in a model of parkinson's disease. *Cell*, 167(6), 1469-1480.e12. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.11.018>
- Sanchez, M., Darimont, C., Drapeau, V., Emady-Azar, S., Lepage, M., Rezzonico, E., Ngom-Bru, C., Berger, B., Philippe, L., Ammon-Zuffrey, C., Leone, P., Chevrier, G., St-Amand, E., Marette, A., Doré, J., & Tremblay, A. (2014). Effect of *Lactobacillus rhamnosus* CGMCC1.3724 supplementation on weight loss and maintenance in obese men and women. *The British Journal of Nutrition*, 111(8), 1507-1519. <https://doi.org/10.1017/S0007114513003875>
- Sayari, S., Neishaboori, H., & Jameshorani, M. (2018a). Combined effects of synbiotic and sitagliptin versus sitagliptin alone in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Clinical and Molecular Hepatology*, 24(3), 331-338. <https://doi.org/10.3350/cmh.2018.0006>
- Sayari, S., Neishaboori, H., & Jameshorani, M. (2018b). Combined effects of synbiotic and sitagliptin versus sitagliptin alone in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Clinical and Molecular Hepatology*, 24(3), 331-338. <https://doi.org/10.3350/cmh.2018.0006>
- Shakeri, H., Hadaegh, H., Abedi, F., Tajabadi-Ebrahimi, M., Mazroii, N., Ghandi, Y., & Asemi, Z. (2014). Consumption of synbiotic bread decreases triacylglycerol and VLDL levels while increasing HDL levels in serum from patients with type-2 diabetes. *Lipids*, 49(7), 695-701. <https://doi.org/10.1007/s11745-014-3901-z>
- Shimizu, K., Yamada, T., Ogura, H., Mohri, T., Kiguchi, T., Fujimi, S., Asahara, T., Yamada, T., Ojima, M., Ikeda, M., & Shimazu, T. (2018). Synbiotics modulate gut microbiota and reduce enteritis and ventilator-associated pneumonia in patients with sepsis: A randomized controlled trial. *Critical Care (London, England)*, 22(1), 239. <https://doi.org/10.1186/s13054-018-2167-x>
- Silva Figueiredo, P., Carla Inada, A., Marcelino, G., Maiara Lopes Cardozo, C., de Cássia Freitas, K., de Cássia Avellaneda Guimarães, R., Pereira de Castro, A., Aragão do Nascimento, V., & Aiko Hiane, P. (2017). Fatty acids consumption: The role metabolic aspects involved in obesity and its associated disorders. *Nutrients*, 9(10). <https://doi.org/10.3390/nu9101158>
- Smith, S. M., & Vale, W. W. (2006). The role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in neuroendocrine responses to stress. *Dialogues*

- in *Clinical Neuroscience*, 8(4), 383-395.
- Sommer, F., & Bäckhed, F. (2013). The gut microbiota—Masters of host development and physiology. *Nature Reviews. Microbiology*, 11(4), 227-238. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2974>
- Sousa, N. (2016). The dynamics of the stress neuromatrix. *Molecular Psychiatry*, 21(3), 302-312. <https://doi.org/10.1038/mp.2015.196>
- Spencer, R. L., & Deak, T. (2017). A users guide to HPA axis research. *Physiology & Behavior*, 178, 43-65. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2016.11.014>
- Średniawa, A., Drwiła, D., Krotos, A., Wojtaś, D., Kostecka, N., & Tomasik, T. (2019). Insomnia and the level of stress among students in Krakow, Poland. *Trends in Psychiatry and Psychotherapy*, 41(1), 60-68. <https://doi.org/10.1590/2237-6089-2017-0154>
- Stadlbauer, V., Leber, B., Lemesch, S., Trajanoski, S., Bashir, M., Horvath, A., Tawdrous, M., Stojakovic, T., Fauler, G., Fickert, P., Högenauer, C., Klymiuk, I., Stiegler, P., Lamprecht, M., Pieber, T. R., Tripolt, N. J., & Sourij, H. (2015). Lactobacillus casei shirota supplementation does not restore gut microbiota composition and gut barrier in metabolic syndrome: A randomized pilot study. *PloS One*, 10(10), e0141399. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0141399>
- Strandwitz, P. (2018). Neurotransmitter modulation by the gut microbiota. *Brain Research*, 1693(Pt B), 128-133. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2018.03.015>
- Takada, M., Nishida, K., Gondo, Y., Kikuchi-Hayakawa, H., Ishikawa, H., Suda, K., Kawai, M., Hoshi, R., Kuwano, Y., Miyazaki, K., & Rokutan, K. (2017). Beneficial effects of Lactobacillus casei strain Shirota on academic stress-induced sleep disturbance in healthy adults: A double-blind, randomised, placebo-controlled trial. *Beneficial Microbes*, 8(2), 153-162. <https://doi.org/10.3920/BM2016.0150>
- Takada, M., Nishida, K., Kataoka-Kato, A., Gondo, Y., Ishikawa, H., Suda, K., Kawai, M., Hoshi, R., Watanabe, O., Igarashi, T., Kuwano, Y., Miyazaki, K., & Rokutan, K. (2016). Probiotic Lactobacillus casei strain Shirota relieves stress-associated symptoms by modulating the gut-brain interaction in human and animal models. *Neurogastroenterology and Motility: The Official Journal of the European Gastrointestinal Motility Society*, 28(7), 1027-1036. <https://doi.org/10.1111/nmo.12804>
- Tantawy, S. A., Abdul Rahman, A., & Abdul Ameer, M. (2017). The relationship between the development of musculoskeletal disorders, body mass index, and academic stress in Bahraini University students. *The Korean Journal of Pain*, 30(2), 126-133. <https://doi.org/10.3344/kjp.2017.30.2.126>
- Tavolacci, M. P., Ladner, J., Grigioni, S., Richard, L., Villet, H., & Dechelotte, P. (2013). Prevalence and association of perceived stress, substance use and behavioral addictions: A cross-sectional study among university students in France, 2009-2011. *BMC Public Health*, 13, 724. <https://doi.org/10.1186/1471-2458-13-724>
- The journal of extension may 1980*. (s. f.). Recuperado 29 de octubre de 2020, de <https://www.joe.org/faes-joe/joe/1980may/>
- Tomasello, G., Mazzola, M., Leone, A., Sinagra, E., Zummo, G., Farina, F., Damiani, P., Cappello, F., Gerages Geagea, A., Jurjus, A., Bou Assi, T., Messina, M., & Carini, F. (2016). Nutrition, oxidative stress and intestinal dysbiosis: Influence of diet on gut microbiota in inflammatory bowel diseases. *Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia*, 160(4), 461-466. <https://doi.org/10.5507/bp.2016.052>
- Torres-Maravilla, E., Lenoir, M., Mayorga-Reyes, L., Allain, T., Sokol, H., Langella, P., Sánchez-Pardo, M. E., & Bermúdez-Humarán, L. G. (2016a). Identification of novel anti-inflammatory probiotic strains isolated from pulque. *Applied Microbiology and*

- Biotechnology*, 100(1), 385-396. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7049-4>
- Torres-Maravilla, E., Lenoir, M., Mayorga-Reyes, L., Allain, T., Sokol, H., Langella, P., Sánchez-Pardo, M. E., & Bermúdez-Humarán, L. G. (2016b). Identification of novel anti-inflammatory probiotic strains isolated from pulque. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(1), 385-396. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7049-4>
- Toth, I. K., Avrova, A. O., & Hyman, L. J. (2001). Rapid identification and differentiation of the soft rot erwinias by 16S-23S intergenic transcribed spacer-PCR and restriction fragment length polymorphism analyses. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(9), 4070-4076. <https://doi.org/10.1128/aem.67.9.4070-4076.2001>
- Tovar, L. R., Olivos, M., & Gutierrez, M. E. (2008). Pulque, an alcoholic drink from rural Mexico, contains phytase. Its in vitro effects on corn tortilla. *Plant Foods for Human Nutrition (Dordrecht, Netherlands)*, 63(4), 189-194. <https://doi.org/10.1007/s11130-008-0089-5>
- Tsavkelova, E. A., Botvinko, I. V., Kudrin, V. S., & Oleskin, A. V. (2000). Detection of neurotransmitter amines in microorganisms with the use of high-performance liquid chromatography. *Doklady Biochemistry: Proceedings of the Academy of Sciences of the USSR, Biochemistry Section*, 372(1-6), 115-117.
- Vazquez, A. (2019, febrero 4). ¿Probióticos en el pulque? *INVDES*. <https://invdes.com.mx/los-investigadores/probioticos-en-el-pulque/>
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., & Lane, D. J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173(2), 697-703. <https://doi.org/10.1128/jb.173.2.697-703.1991>
- West, N. P., Pyne, D. B., Cripps, A. W., Christophersen, C. T., Conlon, M. A., & Fricker, P. A. (2012). Gut Balance, a synbiotic supplement, increases fecal *Lactobacillus paracasei* but has little effect on immunity in healthy physically active individuals. *Gut Microbes*, 3(3), 221-227. <https://doi.org/10.4161/gmic.19579>
- Wilms, E., Gerritsen, J., Smidt, H., Besseling-van der Vaart, I., Rijkers, G. T., Garcia Fuentes, A. R., Masclee, A. a. M., & Troost, F. J. (2016). Effects of supplementation of the synbiotic ecologic® 825/fos p6 on intestinal barrier function in healthy humans: A randomized controlled trial. *PloS One*, 11(12), e0167775. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167775>
- Wong, C. G. T., Bottiglieri, T., & Snead, O. C. (2003). GABA, gamma-hydroxybutyric acid, and neurological disease. *Annals of Neurology*, 54 Suppl 6, S3-12. <https://doi.org/10.1002/ana.10696>
- Yang, L., Zhao, Y., Wang, Y., Liu, L., Zhang, X., Li, B., & Cui, R. (2015). The effects of psychological stress on depression. *Current Neuropharmacology*, 13(4), 494-504. <https://doi.org/10.2174/1570159x1304150831150507>
- Yang, Y.-W., Chen, M.-K., Yang, B.-Y., Huang, X.-J., Zhang, X.-R., He, L.-Q., Zhang, J., & Hua, Z.-C. (2015). Use of 16s rna gene-targeted group-specific primers for real-time pcr analysis of predominant bacteria in mouse feces. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(19), 6749-6756. <https://doi.org/10.1128/AEM.01906-15>
- Zamani, B., Farshbaf, S., Golkar, H. R., Bahmani, F., & Asemi, Z. (2017). Synbiotic supplementation and the effects on clinical and metabolic responses in patients with rheumatoid arthritis: A randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *The British Journal of Nutrition*, 117(8), 1095-1102. <https://doi.org/10.1017/S000711451700085X>

